THESE DE DOCTORAT D'ETAT
ès sciences naturelles

présentée
à l'Université Pierre et Marie Curie - Paris 6 -
par

Michèle Aubery

pour obtenir le grade de
Docteur ès Sciences

MODIFICATIONS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE INDUITES PAR LES LECTINES, EN RELATION AVEC L'ETAT DE DIFFERENCIATION DES CELLULES.

---

soutenue le 15 juin 1976
devant le jury composé de

Monsieur le Professeur J. André Thomas
Membre de l'Institut
Président

Monsieur le Professeur Lucien Hartmann
Examinateur

Monsieur le Professeur Roland Bourrillon
Rapporteur

Monsieur le Professeur Charles Houillon
Rapporteur

Monsieur le Docteur Claude Rosenfeld
Rapporteur

n° d'enregistrement au C.N.R.S. A.O.12.587

THÈSE DE DOCTORAT D'ETAT
ès sciences naturelles

présentée
à l'Université Pierre et Marie Curie - Paris 6
par

Michèle Aubery

pour obtenir le grade de
Docteur ès Sciences

MODIFICATIONS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE INDUITES PAR LES LECTINES, EN RELATION AVEC L'ETAT DE DIFFERENCIATION DES CELLULES.

soutenue le 15 juin 1982
devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Lucien Hoffmann
Membre de l'Institut
Président

Monsieur le Professeur Lucien Hoffmann
Examinateur

Monsieur le Professeur Roland Bourrillon
Rapporteur

Monsieur le Professeur Charles Houillon
Rapporteur

Monsieur le Docteur Claude Rosenfeld
Rapporteur

THESE DE DOCTORAT D'ETAT
ès sciences naturelles

présentée
à l'Université Pierre et Marie Curie - Paris 6 -
par

Michèle Aubery

pour obtenir le grade de
Docteur ès Sciences

MODIFICATIONS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE INDUITES PAR LES LECTINES, EN RELATION AVEC L'ETAT DE DIFFERENCIATION DES CELLULES.

---

soutenue le 15 juin 1976
devant le jury composé de

Monsieur le Professeur J. André Thomas
Membre de l'Institut
Président

Monsieur le Professeur Lucien Hartmann
Examinateur

Monsieur le Professeur Roland Bourrillon
Rapporteur

Monsieur le Professeur Charles Houillon
Rapporteur

Monsieur le Docteur Claude Rosenfeld
Rapporteur

n° d'enregistrement au C.N.R.S. A.O.12.587

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A ma Mère

à qui je dédie cette thèse

A mon Père

Avec toute mon affection et ma profonde reconnaissance.

A ma Grand-Mère

A Pierre et Michèle

A toute ma famille

en témoignage de mon affection.

A Monsieur le Professeur J. André THOMAS, Professeur à la Faculté des Sciences PARIS VII, Membre de l'Académie des Sciences, Membre de l'Académie Nationale de Médecine,

qui me fait le grand honneur d'accepter la Présidence du Jury de cette thèse.

Il m'a initiée à la Biologie Cellulaire par son enseignement et ses précieux conseils.

Il a suivi avec grand intérêt ce travail depuis le début et a toujours témoigné d'une constante bienveillance à l'égard de son élève.

Que mon Maître trouve ici le témoignage de ma profonde et très respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Roland BOURRILLON, Professeur à la Faculté de Médecine PARIS VII,

qui en m'accordant sa confiance m'a permis de devenir un chercheur dans la discipline que j'avais souhaitée.

Par ses conseils et ses critiques, il m'a donné la possibilité d'entreprendre dans son laboratoire une recherche dont les résultats font l'objet de cette thèse.

Qu'il en soit ici très sincèrement remercié. Je le prie de croire à toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Lucien HARTMANN, Professeur à la Faculté de Médecine PARIS VI,

qui a bien voulu me faire l'honneur de juger ce travail avec toute sa haute compétence.

Qu'il trouve ici le témoignage de ma respectueuse reconnaissance jointe à mes remerciements.

A Monsieur le Professeur Charles HOUILLON, Professeur à la Faculté des Sciences PARIS VI

qui a accepté de faire partie du Jury de cette thèse et qui par son enseignement a enrichi mes connaissances au cours de mes études.

Qu'il trouve ici l'expression de mes très sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Claude ROSENFELD, Maître de Recherches à L'INSERM.
Institut de Cancérologie et Immunogénétique. Villejuif.

Sa présence au Jury de cette thèse est une marque d'estime à laquelle je suis particulièrement sensible, sachant le grand intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail.

Qu'il soit très sincèrement remercié.

Je remercie bien chaleureusement les Docteurs Ian MACPHERSON et Charles O'NEILL de m'avoir si gentiment accueillie dans leur laboratoire à l'Imperial Cancer Research Fund (Londres), de m'avoir conseillée et aidée dans la technique d'autoradiographie.

Je remercie très vivement le Docteur Etienne HOLLANDE, Maître Assistant au Laboratoire de Biologie Cellulaire, Centre de Physiologie Cellulaire - Université Pierre et Marie Curie, pour les conseils qu'il n'a cessé de me donner, et pour tous les échanges fructueux et sympathiques qui marquent nos entretiens.

Je remercie bien amicalement

Jacqueline FONT, Chargée de Recherches à l'INSERM, qui m'a si généreusement donné les lectines de Robinia et de Dolichos et leurs anti-sérums.

Marguerite LEMONNIER, Chargée de Recherches à l'INSERM, qui a mis à ma disposition l'hexasaccharide testé comme inhibiteur.

Monique CORNIC
Bruno BERNARD
Roland ROGUET

qui m'ont toujours encouragée et aidée au cours de ce travail,

ainsi que tous les chercheurs du laboratoire pour les nombreux échanges d'idées que nous avons eus.

J'adresse mes plus vifs remerciements

à Monsieur le Docteur François ZAJDELA de la Faculté des Sciences d'Orsay pour m'avoir donné sa souche de cellules ascitiques de rat,

à Mademoiselle le Docteur Anne-Marie STAUB, de l'Institut Pasteur, qui m'a permis d'entreprendre mes toutes premières expériences,

à Monsieur le Professeur Yves GOUSSAULT de la Faculté de Médecine Paris VII, qui eut l'amabilité de me donner le fuco-oligosaccharide testé comme inhibiteur.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Biochimie, Centre de Recherches sur les Protéines - sous la direction du Professeur R. BOURRILLON.

Nos recherches ont bénéficié d'une aide de l'INSERM (Contrat libre n° 71.1.056, contrat n° 74.1.218, ATP n° 2.73.23), du CNRS ERA 321), de l'Université Paris VII, de la Fondation pour la Recherche Médicale.

Nous adressons nos remerciements à ces différents organismes.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION 5

OBJECTIF DES RECHERCHES 17

MATERIEL ET METHODES 19

I - MATERIEL 21

A. Cellules

B. Milieux de culture et solutions salines équilibrées

C. Lectines

D. Inhibiteurs des effets des lectines

II - METHODES 25

A. Préparation des cellules

B. Cultures cellulaires

C. Comptage des cellules

D. Autoradiographie

E. Incorporation d'uridine tritiée

F. Perméabilité cellulaire

G. Essai d'inhibition de l'effet des lectines

H. Test de cytotoxicité

I. Déviation standard des résultats

RESULTATS 35

I - Action des lectines sur la croissance cellulaire 37

A. Croissance cellulaire

1. Croissance cellulaire en absence de lectines

2. Action des lectines à différentes concentrations sur la croissance cellulaire

3. Action des lectines sur la croissance cellulaire en fonction du temps de culture

B. Morphologie des cellules traitées par les lectines

C. Action des lectines sur l'incorporation de thymidine tritiée.

1. Action des lectines à différentes concentrations sur l'incorporation de thymidine tritiée
2. Action des lectines, à différents temps de culture, sur l'incorporation de thymidine tritiée

D. Action des lectines sur l'incorporation de l'uridine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat et dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement
1. Action des lectines, à différentes concentrations, sur l'incorporation d'uridine tritiée
2. Action des lectines à différents temps de culture, sur l'incorporation d'uridine tritiée

II - Spécificité d'action des lectines 106
A. Inhibition des effets des lectines par des monosaccharides
B. Inhibition des effets des lectines par des saccharides urinaires
C. Inhibition des effets des lectines par des sérums anti-lectine

III - Mécanisme d'action des lectines 126
A. Etude de l'action toxique des lectines
1. Etude de l'effet létal des lectines
2. Etude de l'effet toxique des lectines
3. Effet des lectines sur l'adhésivité des cellules au substrat
4. Effet des lectines sur l'incorporation d'uridine tritiée par cellule
B. Action des lectines sur la perméabilité cellulaire
1. Action des lectines sur la perméabilité à la thymidine tritiée
2. Action des lectines sur la perméabilité à l'uridine tritiée

DISCUSSION 145

RESUME 169

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 175

APPENDICE 193

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

. ADN	Acide déoxyribonucléique
. AMP	Adénosine monophosphate
. ARN	Acide ribonucléique
. CM cellulose	Carboxy méthyl cellulose
. DEAE	Diéthyl amino éthyl
. dpm	Désintégration par minute
. E_2	Milieu essentiel de ZAGLE à double concentration en acides aminés et en vitamines
. E_4	Milieu de EAGLE modifié selon DULBECCO
. EDTA	Ethylène diamine tétra acétique
. MEM	Milieu essentiel minimum de EAGLE
. pH	Potentiel d'hydrogène
. TRIS	2 Amino - 2 (hydroxymethyl) - 1, 3 propanediol

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les cellules transformées se distinguent des cellules normales par leur morphologie (OBERLING et BERNHARD 1955, 1961) et diverses caractéristiques biologiques dont la croissance (BANG 1956) et l'adhésivité cellulaire, les propriétés de surfaces cellulaires et l'agglutination par les lectines (DEVILLERS 1955, BURGER 1971).

Au cours de la transformation cellulaire, les cellules subissent des modifications morphologiques ; les cellules transformées sont en général caractérisées par une absence de différenciation, une simplification structurale. Le cytoplasme est basophile, comme celui des cellules jeunes, en rapport avec la teneur en acide ribonucléique ; le noyau est volumineux et atteint souvent le double ou un multiple plus élevé de la dimension normale moyenne. L'hyperplasie nucléaire n'est pas compensée par une augmentation du cytoplasme, si bien que le rapport nucléo-plasmique subit une élévation importante et atteint des valeurs que l'on ne trouve que dans les cellules embryonnaires.

Les cellules normales en cultures primaire, secondaire ou continue réduisent leur taux de croissance quand leur densité de population augmente, contrairement aux cellules transformées. Le contact entre les cellules normales induit une inhibition des mouvements cellulaires appelée "inhibition de mouvement par contact", entrainant directement ou non une inhibition de la croissance cellulaire (MARTZ et STEINBERG 1972, 1973), appelée "inhibition de croissance par contact". Cette inhibition de croissance n'existe plus dans les cellules transformées adultes ou embryonnaires qui ont perdu la propriété d'inhibition par contact (ABERCROMBIE et AMBROSE 1962, ABERCROMBIE 1967, TEMIN 1971, MARTIN et al 1971, VENUTA et RUBIN 1973).

La croissance des cellules normales en culture peut être divisée en deux phases distinctes : une phase logarithmique et une phase stationnaire ; cette dernière dépend de la densité cellulaire. La croissance des cellules transformées est qualitativement différente ; les cellules croissent de façon logarithmique, généralement à une vitesse plus grande que les cellules normales, et continuent à se diviser lorsque les cultures sont à confluence, c'est à dire à une densité cellulaire pour laquelle les cellules normales cessent leur croissance. Ainsi est-il observé in vitro une croissance anarchique des cellules transformées.

Ce phénomène est aussi observé in vivo pour les cellules tumorales au cours de la formation des métastases (EASTY 1974) et pour les cellules embryonnaires au cours du développement (COLLINS 1974).

Cette différence de croissance entre les cellules normales et transformées en culture pourrait refléter, au moins en partie, une différence dans le susceptibilité des membranes à des facteurs sériques ou d'autres substances présentes dans les milieux de culture.

La croissance des cellules normales en culture dépend de la concentration de sérum dans le milieu (REIN et RUBIN 1968, PAUL et al 1971), contrairement à celle des cellules transformées par les virus ou les agents carcinogènes (STOKER et RUBIN 1967, FOSTER et PARDEE 1969, BURGER 1971). Le pH est aussi un facteur régulateur de la croissance des cellules normales (RUBIN 1971, CECCARINI 1971, CECCARINI et EAGLE 1971), tandis que les cellules transformées peuvent croître dans une gamme de pH étendue, sans modification de leur taux de croissance (CECCARINI et EAGLE 1971). Enfin, l'activité de transport des cellules transformées est suffisamment élevée pour permettre leur croissance en suspension (GLINOS et WERRLEIN 1972), tandis que la croissance des cellules normales dépend de leur adhésivité au substrat, en relation avec une activité de transport augmentée (FOSTER et PARDEE 1969, EMMELOT 1973, MARTIN et RUBIN 1974, RILEY 1974). Les cellules tumorales adhèrent moins au substrat de culture que les cellules normales (SANFORD et al 1967) ; une manifestation de cette propriété différentielle réside dans la facilité avec laquelle les cellules transformées sont libérées du substrat de culture par la trypsine. Cependant cette caractéristique ne peut être généralisée, car les cellules transformées par les virus oncogènes adhèrent fortement à différents substrats tel que le verre.

La diminution de l'adhésivité intercellulaire des cellules tumorales est probablement un des facteurs qui conduit à des modifications du comportement social des cellules. Ceci est traduit en culture par la perte de l'inhibition de contact, dans les mouvements cellulaires (ABERCROMBIE et AMBROSE 1962, MACPHERSON et STOKER 1962), et dans la croissance cellulaire (VOGT et DULBECCO 1960). La diminution de l'adhésivité intercellulaire des cellules tumorales peut provenir soit d'une diminution des forces attractives, soit d'une augmentation des forces de répulsion (ABERCROMBIE et AMBROSE 1962) ; ces dernières pouvant augmenter par accroissement des charges

négatives à la surface des cellules (WEISS 1969). Or, dans une étude de la mobilité électrophorétique des cellules, il a été observé que les charges négatives des cellules tumorales sont plus élevées que celles des cellules non transformées (AMBROSE et al. 1956). Cette augmentation des charges de surface est aussi observée dans les cellules provenant d'un organe en régénération et dans les cellules normales durant la mitose.

Ces modifications de l'adhésivité intercellulaire au cours de la transformation cellulaire révèle l'importance des propriétés de surface cellulaire dans les processus de différenciation. En effet, il apparait que les surfaces cellulaires jouent un rôle déterminant dans la régulation de la croissance cellulaire (OREN et KOHN 1969, HYNES 1974), de la morphogénèse et de la différenciation cellulaire (CURTIS 1967, TRINKAUS 1968, PIERCE et JOHNSON 1971), par l'intermédiaire de macromolécules spécifiques. La face externe des membranes plasmiques de cellules d'origines diverses comporte un revêtement glycoprotéique appelé "cell coat" comprenant un pôle hydrophile tourné vers le milieu extérieur et un pôle hydrophobe inclus dans la matrice lipido-protéique. Les données analytiques, immunologiques et histochimiques associées à la microscopie optique et électronique révèlent la présence quasi-générale de ce revêtement de glycoprotéines à la surface des cellules (WEISS 1969, MARTINEZ-PALOMO 1970, WINZLER 1970, RAMBOURG 1971, BURGER 1971).

WALLACH (1968) attribue une signification toute spéciale dans la malignité à ce revêtement qui jouerait un rôle fondamental dans l'inhibition de contact intercellulaire, intervenant dans le contrôle de la croissance cellulaire (PARDEE 1971), la différenciation (COLLINS 1974), la formation des métastases (EASTY 1974). L'acide sialique jouerait un rôle particulier dans ces phénomènes biologiques liés aux membranes (WEISS 1961, ANTEUNIS 1974) car la désialisation, sans attenter à la vie des cellules, modifie la charge électrique de la surface cellulaire (COOK et al. 1961, EYLAR et al. 1962), diminue l'essaimage et l'adhésivité des cellules tumorales in vivo (CORMACK 1970), mais démasque leur antigénicité (CURRIE et BAGSHAWE 1968, a,b). La désialisation réduit donc la formation des métastases (PURDOM et al. 1958, GASIC et GASIC 1962, CORMACK 1970) et entraîne l'agrégation des cellules. La transformation et la différenciation cellulaires provoquent des altérations de la composition chimique des membranes plasmiques (WALLACH 1968) de telle sorte que les surfaces des cellules normales et tumorales sont structurellement différentes. Ceci est reflété fonctionnellement dans les propriétés antigéniques altérées de la cellule et l'agglutinabilité augmentée des cellules

par les lectines, et structurellement par l'analyse chimique et électrophorétique. Les cellules malignes ont une mobilité électrophorétique plus élevée que les cellules normales, associée à un contenu plus élevé en acide sialique (KRAMER 1966) et à une densité plus grande du revêtement glycoprotéique de la membrane (MARTINEZ-PALOMO et al 1969, MARTINEZ-PALOMO 1970). En outre, des modifications biochimiques des surfaces cellulaires ont été observées après transformation maligne ; elles concernent la composition des glycolipides (HAKOMORI et MURAKAMI 1968, ROBBINS et MACPHERSON 1971, HAKOMORI 1970, HAKOMORI 1975) et des glycoprotéines (MEEZAN et al 1969, BUCK et al 1971, WARREN et al 1972).

Les cellules transformées malignes auraient donc une structure de surface spécifique qui serait la base de leur comportement anormal. Cependant il reste à démontrer que les diverses modifications biochimiques observées au cours de la transformation cellulaire sont directement liées à l'état physiologique de la cellule.

Les modifications des macromolécules de surface cellulaire semblent en fait dépendre plus du taux de croissance cellulaire que de la transformation (BUCK et al 1971). PARDEE et ROZENGURT (1974) suggèrent que la membrane cellulaire existerait sous deux états différents qui réguleraient la capacité des cellules à se multiplier. Les cellules normales quiescentes ont leur membrane dans un état Q ; au cours de la mitose et au début de la phase G1 du cycle cellulaire, de telles cellules ont transitoirement leurs membranes dans un état P, favorable à la prolifération cellulaire (DULBECCO 1971, PARDEE et ROZENGURT 1974), état qui représente les propriétés des cellules transformées. Ainsi, les cellules transformées seraient dans un état mitotique permanent quant à leurs propriétés de membrane (POSTE 1971).

Lorsque la membrane passe de l'état Q à l'état P, il est observé une diminution de l'activité de l'adénylate cyclase, une diminution de l'AMP cyclique, une augmentation des transports cellulaires et finalement la stimulation de la croissance cellulaire. Ces modifications sont observées entre les cellules normales et transformées, mais aussi entre les cellules normales quiescentes et en mitose. Les différences dans le taux d'AMP cyclique entre les cellules normales et transformées est surtout évidente dans les cellules en culture stationnaire. Les taux d'AMP cyclique sont liés aux taux de croissance des cellules ; ils s'élèvent nettement dans les cellules normales en culture stationnaire, tandis qu'ils restent stables

ou diminuent dans les cellules transformées en cultures post confluentes (OTTEN et al. 1971). Ainsi, les cellules transformées qui se multiplient très rapidement ont des taux d'AMP cyclique et une activité de l'adényl cyclase inférieure à ceux des cellules parentes normales (OTTEN et al. 1971, HEIDRICK et RYAN 1971, SHEPPARD 1971).

Une autre différence entre les cellules normales et transformées réside dans l'agglutination préférentielle des cellules tumorales par les lectines, tandis que les cellules normales correspondantes ne sont pas agglutinées.

Les lectines sont des agglutinines largement répandues chez les végétaux et qui ont la propriété d'agglutiner les érythrocytes de différentes espèces (MAKELA 1957, BIRD 1959, BOYD 1963, SHARON et LIS 1972). La majorité des lectines sont aspécifiques de groupe sanguin, c'est-à-dire qu'elles agglutinent avec la même intensité les érythrocytes humains normaux du système ABO, quel que soit le groupe sanguin ; d'autres lectines, en nombre limité sont spécifiques des antigènes de groupe sanguin des systèmes ABO et MN (SAINT-PAUL 1961, TRONCHET 1961, BOYD 1963, LIENER 1964 ,(tableau I).

L'intérêt croissant suscité par les lectines provient de leurs effets sur les cellules animales, en particulier de leurs propriétés mitogéniques et cytoagglutinantes. En effet, certaines lectines appelées mitogènes (DOWNING et al. 1968) modifient la croissance cellulaire.
Elles stimulent la croissance et la transformation in vitro des petits lymphocytes humains normaux circulants en cellules de type blastique capables de se diviser (HUNGERFORD et al. 1959, NOWELL 1960, ROBBINS 1964, LING 1968, HARDY et LING 1973), alors que les lymphocytes au repos ne se divisent pratiquement pas. L'agglutination des cellules tumorales par les lectines, récemment mise en évidence par AUB et al. (1963, 1965 a et b) avec la lipase de germe de blé et des cellules tumorales de souris, fut largement étudiée dans l'espoir que ces agglutinines pourraient être utilisées comme marqueurs pour préciser les modifications subies par les cellules au cours de la transformation maligne. La lectine de Phaseolus vulgaris agglutine les cellules du carcinome ascétique d'EHRLICH (STECK et WALLACH 1965) ; la lipase du germe de blé (BURGER 1969) et la Concanavaline A (INBAR et SACHS 1969 a et b) provoquent l'agglutination des cellules leucémiques et de

Tableau I

Caractéristiques de quelques lectines d'origine végétale.

Origine	Nom commun ou abréviation		Mitogénécité	Poids moléculaire	Sous-unités	Spécificité de groupe sanguin	Saccharides inhibiteurs
Canavalia eusiformis	Concanavaline A (Con A)		+	55.000	2	-	α-D-Man α-D-Glc
Dolichos biflorus			-	120.000	4	A1	D-galNAc
Lens culinaris			+	49.000	2	-	α-D-Man α-D-glc
Lotus tetragonolobus			+	120.000	4	H(O)	α-L-Fuc
Phaseolus vulgaris	PHA	I	+	140.000	4	-	aucun
		II	+	140.000	4	-	
Ricinus communis	RCA	I	-	120.000	4	-	β-D-gal
		II	-	60.000	2	-	D-gal et D-gal NAc
Robinia pseudoacacia			+	75.000	2	-	aucun
Triticum vulgaris	Wheat germ (WGA)		-	36.000	2	-	D-glc NAc
Vicia graminea			-	110.000	4	N	aucun

α-D-Man : α-D-mannose ; α-D-glc : α-D-glucose ; α-L-Fuc : α-L-Fucose ; β-D-Gal : β-D-galactose ;
α-D-gal NAc : α-D-N-acétyl-D-galactosamine.

plusieurs lignées cellulaires transformées par les virus oncogènes (virus du polyome, virus simian 40), les carcinogènes ou l'irradiation aux rayons X. Généralement, les cellules normales ne sont pas agglutinables, sauf après une protéolyse limitée (AUB et al 1963, INBAR et SACHS 1969 a et b, SELA et al 1970, BURGER et NOONAN 1970). Il faut cependant souligner que la corrélation n'est pas absolue entre la transformation cellulaire et l'agglutination par les lectines. En particulier différents types de cellules transformées par des virus à ARN ne sont pas agglutinées (AUB et al 1965 a et b, LISKE et FRANCK 1968, SELA et al 1970, BURGER 1973).

Plus récemment, il a été observé que les cellules embryonnaires répondent aux lectines de façon différente selon le stade de développement et la nature de la lectine utilisée. MOSCONA (1971) a montré que les cellules de la rétine neurale d'embryon de poulet, dissociées par la trypsine ou par l'EDTA, sont fortement agglutinées par le Concanavaline A. KLEINSCHUSTER et MOSCONA (1972) montrent que l'agglutinabilité de ces cellules par la Concanavaline A diminue au cours du développement embryonnaire, tandis qu'elle reste constante sous l'effet de la lectine de Ricin. Ces cellules ne sont à aucun moment agglutinées par la lectine du germe de blé. Des résultats semblables ont été obtenus avec les cellules d'embryon d'oursin (LALLIER 1972, OPPENHEIMER et ODERCRANTZ 1972, KRACH et al 1973), et avec les cellules intestinales d'embryon humain (WEISER 1972).

Ces résultats pour préliminaires qu'ils soient, laissent apparaître que les cellules embryonnaires se comportent différemment envers les lectines selon leur âge. Les cellules embryonnaires jeunes, agglutinées par les lectines se comportent comme des cellules tumorales, tandis que les cellules embryonnaires plus âgées, comme les cellules normales adultes ne sont généralement pas agglutinées par les lectines. Ces résultats sont de grand intérêt car plusieurs observations avaient déjà souligné la relation entre la cellule embryonnaire et la cellule maligne. Les antigènes de différenciation (EBERT 1959, FLICKINGER 1962, MOSCONA 1962) présents à la surface des cellules embryonnaires et qui seraient l'expression phénotypique du développement et de la différenciation (MOSCONA 1971, GOLDSCHNEIDER et MOSCONA 1972) disparaissent ou subissent des modifications dans la cellule adulte, et réapparaissent seulement dans les cellules malignes (STONEHILL et BENDICH 1970). Ces observations suggèrent une grande similitude entre les antigènes embryonnaires et malins (GOLD et al 1968). La malignité

pourrait refléter un retour à l'état embryonnaire, tandis que la différenciation normale abolit les caractéristiques embryonnaires (STONEHILL et BENDICH 1970, MOSCONA 1971, KLEINSCHUSTER et MOSCONA 1972).

Ces effets des lectines sur les cellules ne sont pas tous encore bien compris, mais il est prouvé qu'ils résultent d'un phénomène de surface (NOWELL 1960, ROBBINS 1964, LING 1968, HARDY et LING 1973, NICOLSON 1974). Les lectines réagiraient initialement avec des sites récepteurs plus ou moins spécifiques situés à la surface des cellules (BORBERG et al 1968, POWELL et LEON 1970, NICOLSON 1974), et l'interaction entre les lectines et ces sites constitueraient le préalable nécessaire à l'initiation des effets des lectines sur les cellules normales et transformées.

Cette interprétation est confirmée par de nombreuses observations essentiellement avec des lectines rendues fluorescentes ou radiomarquées (YAHERA et EDELMAN 1973, BUFFE et al 1971, MALLUCI 1971, SHOHAM et SACHS 1972, INBAR et al 1973 a et b, NICOLSON 1973 a et b, NOONAN et BURGER 1973 a et b), avec des lectines marquées à la ferritine (NICOLSON et SINGER 1971, NICOLSON 1971), à la péroxydase (BERNHARD et AVRAMEAS 1971) ou à l'hémocyanine (SMITH et REVEL 1972). La liaison des lectines sur les surfaces des cellules normales et transformées a été observée en microscopie optique et électronique. Une connaissance plus approfondie des sites récepteurs fut rendue possible par l'utilisation de lectines radiomarquées, ce qui à la fois démontre la liaison entre les lectines et les cellules, et précise le nombre de sites de liaison par cellule ainsi que la constante d'affinité de cette interaction. La spécificité de cette liaison et son caractère obligatoire pour que s'exercent les effets des lectines sur les cellules, est démontrée par des études d'inhibition hapténique avec des monosaccharides ou des glycoconjugués (MAKELA 1957, POLLACK et BURGER 1969, POWELL et LEON 1970, OZANNE et SAMBROOK 1971, NOVOGRODSKY et KATCHALSKI 1973) ou des antisérums monospécifiques (KAY et OPPENHEIM 1971, ROGUET et BOURRILLON 1975, SHARIF et BOURRILLON 1975).

Ces inhibiteurs spécifiques suppriment les effets cellulaires de la lectine correspondante, mais pas ceux des autres lectines. Les résultats obtenus confirment en outre la nature glucidique des sites récepteurs de lectines.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets des lectines sur la croissance et l'agglutinabilité cellulaires sont encore méconnus. Il est toutefois connu que l'interaction entre les lectines mitogéniques et des sites récepteurs spécifiques présents à la surface des petits lymphocytes déclenche un signal au niveau de la membrane plasmique dont la transmission à l'intérieur de la cellule entraine une série d'évènements morphologiques et biochimiques qui sont communs à de nombreuses cellules subissant une croissance active et qui se traduisent par la division mitotique et la transformation des lymphocytes (SHARON et LIS 1974). L'importance de l'interaction préalable entre les lectines et les membranes des cellules provoquant la mitose ou l'agglutination des cellules suggère l'intervention d'un inducteur membranaire, relativement peu spécifique, qui pourrait être l'adényl cyclase. Cette hypothèse est étayée par le fait que certaines lectines ont des effets sur les cellules (adipocytes) qui ressemblent à ceux induits par les hormones telle que l'insuline, dont les actions dépendent de l'AMP cyclique (CUATRACASAS et TELL 1973). Il semble que le changement de conformation de la membrane provoqué par les lectines entraine une modification de l'activité de l'adényl cyclase qui est un composant intégral de la membrane des cellules (SUTHERLAND 1962).

L'interaction entre les lectines mitogéniques et les lymphocytes entraine rapidement une augmentation passagère de l'activité de l'adényl cyclase et du taux de l'AMP cyclique (SMITH et al 1971, HARDY et LING 1973), une captation et un transport accrus des petits molécules (KAY et HANDMAKER 1970, PETERS et HAUSEN 1971 a et b, MENDELSON et al 1971), l'acétylation des histones qui semble précéder la synthèse de l'ARN nucléaire (POGO et al 1966). Peu de temps après se produisent la phosphorylation des protéines nucléaires (KLEINSMITH et al 1966) et des modifications du métabolisme des protéines (KAY 1968) et des glucides (ROOS et LOOS 1970). Ensuite est observée une augmentation du taux des protéines nucléaires (MUELLER et MAHIEU 1966) et de l'ARN (Mc INTYRE et EBAUGH 1962, COOPER et RUBIN 1965) ; cette dernière est traduite par une augmentation de l'incorporation d'uridine dans les lymphocytes. Il s'agit bien d'une synthèse réelle de l'ARN et non d'une augmentation de la perméabilité de la cellule à l'uridine qui produirait un accroissement du pool des nucléotides (KILLANDER et RIGLER 1965, COOPER et RUBIN 1965). Enfin, après quarante huit heures de stimulation par les lectines, la synthèse asynchrome de l'ADN se produit dans les cellules

(COOPER et al 1963, Mc KINNEY et al 1962, COOPER 1969 et 1971) qui entrent alors en mitose. L'incorporation de thymidine, témoin de la synthèse de l'ADN, commence vingt quatre à trente six heures après l'addition de lectine et atteint un maximum vers la soixante douzième heure, en même temps que les transformations morphologiques deviennent évidentes.

Si l'action des lectines sur la croissance des lymphocytes est bien étudiée, il n'en est pas de même pour d'autres types cellulaires.

OBJECTIF DES RECHERCHES

L'agglutinabilité différentielle des cellules normales et tumorales, et des cellules embryonnaires selon l'âge de l'embryon induite par les lectines suggère l'usage de ces protéines pour élucider les modifications que subissent les cellules au cours de la différenciation et de la tumorisation.

Or, si les différences dans les caractéristiques de croissance des cellules normales et transformées en culture sont bien établies, les études des effets des lectines sur la croissance cellulaire et la biosynthèse de l'ADN dans les cellules sont pour l'essentiel limitées aux lymphocytes humains normaux. Seules quelques études erratiques ont été consacrées à l'effet des lectines mitogéniques sur la prolifération des cellules épithéliales humaines (SARKANY et CARON 1965, IOACHIM 1966), des organismes unicellulaires (AGREL 1966, ZECH 1966), des cellules végétales (NAGL 1971), des cellules tumorales (BURGER et NOONAN 1970, SHOHAM et al 1970, DENT 1971). Encore ces études ont-elles généralement été réalisées sur des cellules en lignée continue qui ont perdu la plupart des propriétés des cellules originelles au cours de l'établissement et du maintien des lignées (SIVAK 1971).

Les recherches que nous avons entreprises ont pour objet de combler certaines de ces lacunes et d'aborder le problème de différences entre des cellules selon leur état de différenciation, sous l'aspect de leur croissance en primoculture et sous l'influence des lectines. En outre, on ignore si les lectines peuvent modifier le programme de synthèse des acides nucléiques dans d'autres cellules que les lymphocytes. C'est pourquoi parallèlement à la croissance des cellules sera étudiée l'incorporation de thymidine et d'uridine marquées dans ces cellules.

Enfin, ces études concerneront à la fois la différenciation tumorale et la différenciation embryonnaire des cellules, et les résultats obtenus seront discutés dans le cadre de la relation entre l'état cancéreux et l'état embryonnaire.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I MATERIEL

A. Cellules

1. Cellules hépatiques normales et tumorales du rat

Les cellules hépatiques normales proviennent de jeunes rats mâles Wistar de 120 grammes (Ch. River).

Les cellules tumorales proviennent de rats porteurs d'un hépatome de Zajdela. L'hépatome a été initialement induit par voie chimique chez le rat Wistar par le diméthylaminobenzène. La souche nous a été donnée par le Docteur ZAJDELA de la Faculté des Sciences d'Orsay.

2. Cellules de rein de hamster nouveau-né : BHK 21/C13 et BHK 21/Py

Il s'agit de fibroblastes normaux et transformés par le virus du polyome (Py H6). Le travail réalisé sur ces deux lignées cellulaires a été effectué dans le laboratoire du Docteur MACPHERSON, en collaboration avec le Docteur O'NEILL.

3. Fibroblastes d'embryon de poulet (White Leghorn)

Les cellules sont prélevées à différents stades du développement.

B. Milieux de culture et solutions salines équilibrées

Les milieux de culture utilisés sont le milieu minimum essentiel de EAGLE, et le milieu de EAGLE modifié selon DULBECCO ; les compositions des milieux et des solutions salines équilibrées ainsi que leur liste sont données en Appendice.

C. Lectines

1. La lectine extraite de Robinia pseudoacacia est purifiée par précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium, par chromatographie sur DEAE cellulose et par chromatographie sur hydroxyapatite (BOURRILLON et FONT 1968) ; cette lectine est une glycoprotéine de poids moléculaire 75.000 ; elle comprend 10,7 % de constituants glucidiques (FONT et BOURRILLON 1971) ; elle présente à la fois une action érythroagglutinante et une activité mitogénique.

2. La lectine extraite de Dolichos biflorus est purifiée par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, par filtration sur Sephadex G 100 et chromatographie sur CM Cellulose (FONT et al 1971). Cette lectine a un poids moléculaire de 120 000 (PERE et al 1974) et comprend 3,8 % de constituants glucidiques. Elle ne possède pas d'activité mitogénique. Elle a la propriété d'agglutiner spécifiquement les érythrocytes humains de groupe A1 ; l'agglutination induite par cette lectine est inhibée spécifiquement par la N-acetyl-D-galactosamine ou ses D-glycosides (ETZLER et KABAT 1970).

3. La Concanavaline A provient de Sigma (grade III, lots 910 SOLO et C2631). Cette lectine ne contient pas de constituants glucidiques. Son poids moléculaire est de 55.000.

D. Inhibiteurs des effets des lectines

1. Monosaccharides

L'α méthyl-D-mannopyranoside et la N-acétyl-galactosamine sont utilisées à des concentrations qui varient de 0.02 à 19,4 µg/ml.

2. Deux saccharides urinaires ont été testés à des concentrations variant de 0.08 à 40 µg/ml.

- un hexasaccharide (LEMONNIER et BOURRILLON 1973) dont la structure est connue (fig 1) et identique à celle du dilactaminyl-lacto-N-tétraose isolé du lait de femme (GRIMMONPREZ et al 1970).

- un fuco-oligosaccharide (BOURRILLON et GOUSSAULT 1968) porteur d'un résidu L-fucose en position terminale non réductrice.

La composition de ces deux saccharides est rapportée dans le tableau II

3. Sérums anti-lectine

Les sérums de lapin anti-lectine de Robinia, de Dolichos ou anti-Concanavaline A sont obtenus en injectant en différents points des coussinets plantaires de l'animal 1 mg de lectine dissous dans 0,5 ml de NaCl 0.15 M, émulsifié avec 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund (Difco). Les injections sont répétées huit jours plus tard dans les mêmes conditions. Ensuite, trois injections sous-cutanées de 1 mg de lectine sont effectuées en différents points du dos de l'animal, ces injections étant séparées par un intervalle de 15 jours. Une semaine après la troisième injection, le sang est prélevé par ponction cardiaque. Le sérum obtenu est testé par immunoélectrophorèse, puis stérilisé par filtration sur filtre milipore et conservé en ampoules scellées à + 4°C.

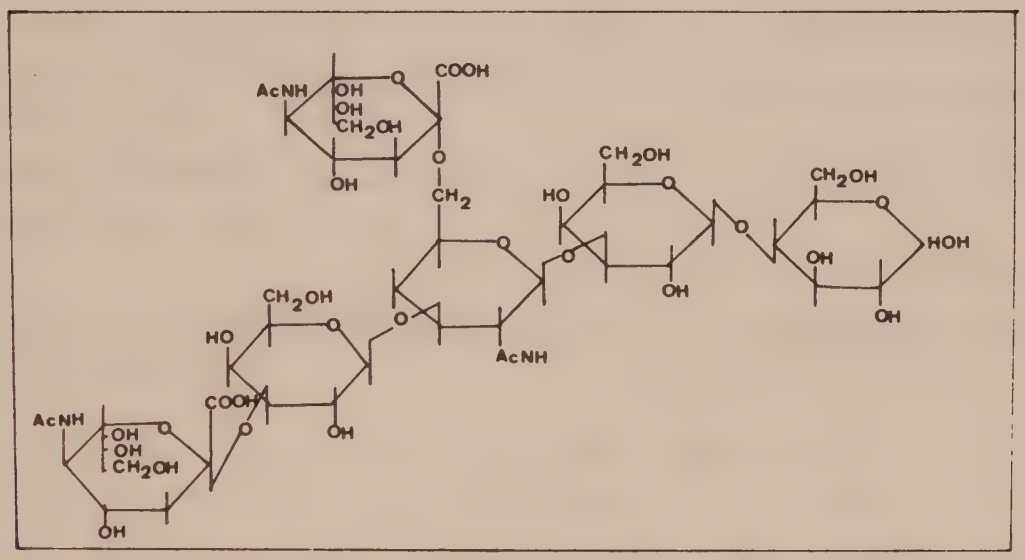


Figure 1 Structure d'un hexasaccharide urinaire testé comme inhibiteur de l'activité de la lectine de Robinia et de la Concanavaline A (LEMONNIER et BOURRILLON 1976).

Tableau II

Composition molaire en glucides des saccharides urinaires utilisés comme inhibiteurs hapténiques.

	Gal	Man	Glu	Fuc	GlcNac	GalNAc	ANAN
Hexasaccharide urinaire (1.10^3)	2	-	1	-	1	-	2
Fuco-oligosaccharide urinaire (3.10^3)	9	2	1	5	5	1	-

Gal : Galactose ; Man : Mannose ; Glu : glucose ; Fuc : Fucose ;
GlcNAc : N acétylglucosamine ; Gal NAc : N-acetylgalactosamine ;
ANAN : acide N-acétylneuraminique.

Les poids moléculaires de chacun de ces composés sont indiqués entre parenthèses.

II METHODES

A. Préparation des cellules

Les cellules hépatiques tumorales de rat, et les cellules BHK 21/C13 et BHK 21/Py sont des cellules isolées et leur préparation est simple ; les cellules hépatiques normales de rat et les fibroblastes d'embryon de poulet doivent être quant à elles préalablement dissociées de leurs tissus d'origine.

1. Cellules hépatiques tumorales de rat (Hépatome de ZAJDELA)

La souche est entretenue sur des rats mâles Wistar (Ch. River) par inoculation intrapéritonéale de 0,25 ml de liquide d'ascite contenant environ 2×10^7 cellules. La prise de la greffe se fait en 6-8 jours. Les cellules sont prélevées par ponction à travers la paroi abdominale du rat. Les cellules sont lavées deux fois dans le milieu de EAGLE (E2).

2. Cellules de rein de hamster nouveau né : BHK 21/C13 et BHK 21/Py (MACPHERSON et STOKER 1962).

Les cellules de lignée continue sont repiquées deux fois par semaine. Après récolte, les cellules sont réensemencées à raison de $0,1 \times 10^6$ cellules/ml (BHK 21/C13) et $0,05 \times 10^6$ cellules/ml (BHK 21/Py) dans des boites de Petri Falcon de 10 cm de diamètre, contenant 10 ml de milieu de Eagle, modifié selon DULBECCO (E4) et additionné de 10% de sérum de veau.

3. Cellules hépatiques normales du rat et fibroblastes d'embryon de poulet

a) Principe

Deux méthodes sont généralement utilisées pour dissocier les tissus en cellules isolées avec un minimum d'altération. Ce sont la dissociation protéolytique et la dissociation mécanique. MOSCONA (1952) incube des fragments d'organe d'embryon de poulet en présence de trypsine et obtient des cellules isolées susceptibles d'être cultivées. Cette méthode est la méthode de choix pour la dissociation des tissus embryonnaires jeunes, mais les tissus deviennent plus résistants à la dissociation trypsique lorsque leur âge augmente (STEINBERG 1968). La trypsine est la protéase la plus largement employée, bien que la collagénase soit aussi utilisée. Toutefois les méthodes diffèrent selon les auteurs.

La dissociation des cellules est en outre favorisée par un procédé mécanique, par exemple, agitation au vortex, pipetage, agitation à l'aide d'un barreau aimanté dans un champ magnétique tournant. Cette dissociation mécanique peut intervenir soit pendant la trypsinisation, soit après la trypsinisation dans le milieu de culture contenant du sérum. Lorsqu'elle peut être utilisée, cette dissociation en l'absence de trypsine s'avère le procédé le plus doux, et permet de conserver au glycolemme une structure plus proche de la réalité.

b) Techniques

. Cellules hépatiques normales de rat

Le foie est prélevé stérilement sur un rat mâle Wistar de 120 grammes ; les lobes sont découpés en petits fragments, et ceux-ci sont lavés dans le milieu de EAGLE (E2) jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Les cellules sont ensuite dispersées selon l'une des méthodes suivantes :

- trypsine : une solution de trypsine Difco à 0,25 g dans 100 ml de liquide de EARLE dépourvu d'ions Ca^{++} et Mg^{++} (pH 7,1) est ajoutée (20 ml) aux fragments. Après 10 minutes, sous agitation modérée à la température du laboratoire, le surnageant est éliminé, et 20 ml de la même solution de trypsine sont ajoutés aux fragments de tissus. Cette 2ème phase de trypsinisation est poursuivie pendant 45 minutes dans les conditions suivantes : après 15 minutes, le surnageant est prélevé, centrifugé à 800 tours/mn pendant 5 mn, puis les cellules sont reprises dans le milieu de EAGLE contenant 10 % de sérum de veau foetal (connu comme contenant des inhibiteurs de l'action de la trypsine, MOSCONA 1963). A la fin de cette phase de trypsinisation, l'ensemble des cellules est réuni, lavé trois fois dans le milieu de EAGLE (E2) additionné de 10 % de sérum de veau foetal.

La suspension des cellules hépatiques est examinée au microscope à contrast de phase (X 600) ; la population cellulaire ne contient que des cellules de type épithélial et 5-6 % de globules rouges.

- mécanique : les fragments sont passés à travers un tamis cellulaire de 500 µm de porosité, à l'aide d'un pilon. Le filtrat obtenu est passé à travers un second tamis de 60 µm de porosité. Le second filtrat est centrifugé 5 mn à 800 tours/minute. Le surnageant est éliminé, les cellules sont reprises dans le milieu de EAGLE et lavées trois fois dans ce milieu. Le dernier culot est repris dans le milieu de EAGLE contenant 10 % de sérum de veau foetal.

La suspension cellulaire, après examen en contraste de phase est homogène et contient 92-95 % de cellules de type épithélial et 3 % de globules rouges.

. Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

Les embryons de 6 à 12 jours d'incubation sont décapités, éviscérés les bourgeons des membres ou les membres sont éliminés. Dans le cas d'embryons plus âgés, il est nécessaire d'éliminer les plumes avant de prélever les muscles. Ensuite, quelque soit l'âge de l'embryon, les opérations sont identiques. Les tissus sont découpés en petits fragments qui sont lavés dans le milieu de EAGLE jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Les cellules sont ensuite dispersées selon l'une des méthodes suivantes :

- trypsine : la méthode utilisée est celle décrite pour les cellules hépatiques normales de rat. La suspension de fibroblastes obtenue dans ces conditions contient 3-4 % d'érythrocytes.

- mécanique : la méthode utilisée est identique à celle utilisée pour les cellules hépatiques normales de rat. Pour obtenir une bonne dispersion cellulaire, il est nécessaire de passer la suspension à travers une aiguille (0,60 x 2,5 mm) à l'aide d'une seringue. Cette opération est répétée deux fois. La suspension cellulaire est homogénéisée par pipetage. La contamination par les érythrocytes est approximativement de 3 %.

A l'examen microscopique en contraste de phase, la suspension cellulaire apparait composée de cellules libres, de cellules agrégées deux à deux et d'agrégats de plus de deux cellules (3 à 10 cellules). Ces agrégats sont d'autant plus importants que les cellules proviennent d'embryons jeunes.

B. Cultures cellulaires

Au cours de l'établissement et du maintien des lignées, les cellules perdent leurs caractéristiques et certaines propriétés de surface. Dans ce cas, la comparaison à un témoin reste hypothétique (SIVAK 1971). Les cultures primaires ne présentent pas cet inconvénient, bien que dans certains cas de cellules spécialisées précocemment au cours du développement embryonnaire, une dédifférenciation cellulaire ait été observée. Ainsi, les cellules pigmentaires de la rétine de l'embryon de poulet perdent leur capacité de synthétiser la mélanine après 12 heures de culture, la pigmentation pouvant d'ailleurs réapparaître dans certaines conditions de culture (WHITTAKER 1967, CAHN et CAHN 1966).

1. Primocultures

a) Cellules hépatiques normales et tumorales de rat

Les cultures sont effectuées en boite de Petri de 50 mm de diamètre, dans 3,25 ml de milieu de EAGLE (E2) additionné de 10 % de sérum de veau foetal.

La concentration cellulaire initiale est respectivement de 1 x 10^6 et 0,25 x 10^6 cellules/ml pour les cellules normales obtenues par dissociation mécanique, et les cellules tumorales. Les cultures sont placées à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % CO_2.

Dans le cas des cellules normales, la culture est de 72 heures ; elle est de 8 heures dans le cas des cellules tumorales (culture courte de type primaire).

b) Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

Les primocultures en monocouche sont effectuées en boite de Petri de 50 mm de diamètre dans 3,25 ml de milieu de EAGLE (E2) additionné de 10 % de sérum de veau foetal. La concentration cellulaire initiale est de 0,5 x 10^6 cellules/ml.

Les cultures sont placées à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO_2. Les fibroblastes ne sont pas repiqués pendant la durée de la culture qui n'excède pas 3 jours (culture courte de type primaire).

Au cours de l'étude de la prolifération cellulaire en absence de lectine, différents paramètres sont étudiés : la concentration cellulaire initiale (0,25 et 0,5 x 10^6 cellules/ml), les conditions de culture (flacon Falcon de 25 cm^2 de surface, boite de Petri de 50 mm de Ø), l'influence du mode de dispersion (trypsique ou mécanique).

2. Cultures continues

Cellules de rein de hamster nouveau né : BHK 21/C13 et BHK 21/Py

Les cultures sont réalisées en boite de Petri de 50 mm de diamètre dans 3,25 ml de milieu de EAGLE, modifié selon DULBECCO, contenant 10 % de sérum de veau. La concentration cellulaire initiale est de 0,1 x 10^6 cellules/ml (0,16 x 10^5 cellules/cm^2) dans le cas des cellules BHK 21/C13 et de 0,05 x 10^6 cellules/ml, dans le cas des cellules BHK 21/Py.

Les cultures sont placées à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO_2. Au cours des expériences, aucun repiquage n'est effectué pendant la durée de la culture.

C. Comptage des cellules

Les comptages des cellules sont effectués à différents temps de culture.

1. Cellules hépatiques normales et tumorales de rat

Les cellules hépatiques normales de rat, qui adhèrent au substrat sont détachées des boites de culture à l'aide d'un grattoir et remises en

suspension, par pipetage dans le milieu de EAGLE contenant 10 % de sérum de veau foetal.

. Les cellules hépatiques tumorales de rat n'adhèrent pas au substrat Il suffit d'homogénéiser la suspension cellulaire pour effectuer les comptages.

Les comptages sont effectués à la cellule de Malassez, pour la routine. Les comptages au Coulter Counter permettent une vérification de ces comptages. Le volume cellulaire est de 3000 à 4500 μ^3 pour les cellules hépatiques normales (ZILHART, communication personnelle), et de 2000 à 2500 μ^3 pour les cellules hépatiques tumorales (CORNIC 1975).

2. Cellules de rein de hamster nouveau-né : BHK 21/C13 et BHK 21/Py

Les cellules adhèrent au substrat, elles sont lavées deux fois avec une solution de trypsine (0.005 % final) et d'EDTA (0,02 % final), puis incubées à 37°C pendant 5 minutes. Ensuite, les cellules sont mises en suspension dans le milieu de EAGLE (E4) contenant 10 % de sérum de veau. Les cellules sont comptées au Coulter Counter (modèle B) et dans certains cas à la cellule de Malassez. Le volume cellulaire est de 1100 à 1200 μ^3 (O'NEILL, communication personnelle).

3. Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

Les cellules adhèrent au substrat, et sont détachées des boites de culture à l'aide d'un grattoir et remises en suspension dans le milieu de EAGLE (E2) additionné de 10 % de sérum de veau foetal.
Les comptages sont effectués à la cellule de Malassez, et contrôlés au Coulter Counter. Le volume cellulaire est compris entre 1000 et 1100 μ^3 et ne varie pas au cours du développement (CORNIC, 1975).

Tous les comptages à la cellule de Malassez sont effectués après coloration vitale au Bleu trypan, et les courbes de croissance ne représentent que le nombre de cellules viables.

4. Autoradiographie

L'incorporation de thymidine tritiée est déterminée en autoradiographie. La méthode utilisée est celle de DULBECCO et STOKER (1970). La thymidine tritiée (Radiochemical Centre Amersham - activité spécifique 26 Ci/mMole) à la concentration de 3 µCi est ajoutée aux cultures à des temps variables selon les types cellulaires. Après ce temps, les cultures sont préparées

pour l'autoradiographie. Le milieu de culture est éliminé, les cellules sont fixées au formol (10 % en solution NaCl 0.15 M pendant 1 minute, puis lavées deux fois 2 minutes avec la solution saline équilibrée TRIS ; les protéines sont précipitées par deux lavages, chacun de 5 minutes, dans une solution froide d'acide trichloracétique à 5 %.

Les cellules sont ensuite lavées à l'éthanol, les boites de culture sont séchées, recouvertes d'une mince couche d'alun de chrome et séchées de nouveau à 37°C. Les opérations sont poursuivies en chambre noire. Les cultures sont recouvertes du film KODAK AR 10, et laissées en contact 48 heures. Les films sont révélés pendant 4 minutes (révélateur D 19 KODAK), lavés à l'eau distillée, fixés pendant 5 minutes (ILFORD) et lavés deux fois à l'eau distillée. Puis les cultures sont colorées au Giemsa pendant 25 minutes.

Les noyaux marqués sont comptés et le rapport du nombre de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée au nombre de noyaux totaux par heure est appelé "index de marquage".

1. Cellules hépatiques normales et tumorales de rat

La thymidine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture, ou bien aux 20ème, 44ème et 68ème heures de la culture. L'autoradiographie est alors effectuée aux 24ème, 48ème et 72ème heures de culture dans le cas des cellules hépatiques normales de rat.

Dans le cas des cellules hépatiques tumorales de rat, la thymidine tritiée est ajoutée après 1, 3, 5 et 7 heures de culture, et l'autoradiographie réalisée aux 2ème, 4ème, 6ème et 8ème heures de culture.

2. Cellules de rein de hamster nouveau-né : BHK 21/C13 et BHK 21/Py

Dans le cas de cultures en croissance, la thymidine tritiée est ajoutée aux 20ème, 44ème et 68ème heures de culture, et l'incorporation de thymidine tritiée déterminée aux 24ème, 48ème et 72ème heures de culture.

Dans le cas de cultures stationnaires, la thymidine tritiée est ajoutée à 0 heure et aux 24 ème et 48ème heures de culture, et l'incorporation de thymidine tritiée déterminée aux 24ème, 48ème et 72ème heures de culture.

3. Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

La thymidine tritiée est ajoutée aux 20ème, 44ème et 68ème heures de culture et l'incorporation déterminée aux 24ème, 48ème et 72ème heures de culture.

E. Incorporation d'uridine tritiée

3 µCi d'uridine tritiée (Radiochemical Centre Amersham - activité spécifique : 27 Ci/mMole) sont ajoutés aux cultures à des temps variables selon le type cellulaire. Les cellules sont détachées du substrat à l'aide d'un grattoir, puis lavées deux fois dans une solution de NaCl 0,15 M.

. Le matériel cellulaire ayant incorporé l'uridine tritiée est précipité par 2 ml d'une solution froide d'acide trichloracétique à 10 %. Après 12 heures à 4°C, une centrifugation de 5 minutes à 4000 tours/minute permet d'obtenir deux fractions :

. Le surnageant, qui contient la fraction marquée acide soluble (cf perméabilité cellulaire)

. Le culot, qui contient la fraction marquée acido insoluble. Ce culot est lavé deux fois par une solution froide d'acide trichloracétique à 5 %, les deux surnageants de lavages sont testés et ne contiennent pas de radioactivité. Puis le culot est repris dans 10 ml d'Instagel et la radioactivité est déterminée dans le spectromètre à scintillation liquide Intertechnique (Modèle SL 30).

1. Cellules hépatiques tumorales de rat

Afin d'étudier la cinétique d'incorporation, l'uridine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture, et la radioactivité est déterminée à des temps variant de 5 minutes à 8 heures.

2. Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

L'uridine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture et la radioactivité est déterminée à des temps variant de 15 minutes à 72 heures.

F. Perméabilité cellulaire

La perméabilité cellulaire à la thymidine et à l'uridine tritiées est étudiée selon la méthode décrite par STAMBROOK et al (1973). La perméabilité est égale à la somme du précurseur radioactif incorporé soit dans le DNA, soit dans le RNA, et du précurseur radioactif présent dans le matériel acido-soluble.

1. Perméabilité à la thymidine tritiée

Les cellules reçoivent 3 µCi de thymidine tritiée et sont traitées comme indiqué dans le paragraphe E. La radioactivité est déterminée dans le surnageant acido soluble.

a) cellules hépatiques tumorales de rat

La thymidine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture et la radioactivité déterminée à des temps variant de 5 minutes à 30 minutes.

b) fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

La thymidine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture et la radioactivité déterminée à des temps variant de 15 minutes à 4 heures.

2. Perméabilité à l'uridine tritiée

Les cellules sont traitées dans les mêmes conditions expérimentales que celles indiquées dans le paragraphe E. La radioactivité est déterminée dans le surnageant acido soluble.

G. Essai d'inhibition de l'effet des lectines

1. Principe

Des doses décroissantes d'un composé supposé inhibiteur sont incubées avec le double de la quantité minimum de lectine qui provoque une modification de la croissance cellulaire.

L'inhibiteur et la lectine sont incubés 30 mn à 37°C. Le mélange est ajouté aux cultures.

L'efficacité d'inhibition de ce composé vis à vis de la lectine est évaluée par l'effet du mélange sur la croissance des cellules. Les courbes de croissance des cellules témoins et des cellules traitées par la lectine servent de référence. Lorsque la courbe obtenue avec le mélange composé-lectine est identique à la courbe de croissance des cellules témoins, la lectine a été neutralisée par ce composé qui s'est fixé sur elle et présente donc les caractères d'un inhibiteur. Quand la courbe de croissance obtenue avec le mélange composé-lectine est identique à la courbe de croissance des cellules traitées par la lectine seulement, l'effet de la lectine n'étant pas modifié, ce composé ne présente pas de caractère inhibiteur.

2. Technique

0,1 ml de la solution de lectine (20 µg) sont incubés pendant 30 minutes à 37°C avec 0,1 ml de solution d'inhibiteur. Le mélange est ajouté aux cultures. Le nombre de cellules est déterminé après 72 heures dans le cas des cellules hépatiques normales de rat, après 8 heures dans le cas des cellules hépatiques tumorales de rat, et après 24 heures dans le cas des fi-

.broblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours.

H. test de cytotoxicité

1. Viabilité cellulaire

Au moment de chaque comptage, la viabilité cellulaire est estimée par l'exclusion du bleu trypan. Les cellules mortes s'imprègnent de colorant contrairement aux cellules vivantes. La pénétration du colorant serait due à la perte de l'activité protectrice de la membrane cellulaire (PAUL 1970).

2. Effet toxique

a) Principe

Le test de cytotoxicité permet de déceler les antigènes de surface. Le mécanisme par lequel le bleu trypan pénètre à l'intérieur de la cellule n'est pas encore totalement expliqué. Il peut s'agir d'une action directe des anticorps, qui, en détruisant une portion de la membrane cytoplasmique au niveau du site antigénique (GREEN et al. 1959, EASTON et al. 1962 a et b, BORSOS et al. 1964) provoquent la pénétration du colorant par cette brèche ; ou bien d'une action indirecte, l'adsorption des anticorps sur la membrane dérèglerait le phénomène responsable de la non-pénétration du bleu trypan, entrainant une variation de la concentration ionique endo-cellulaire (GREEN et al. 1959) ou un ré-arrangement des charges à la surface de la cellule (FORRESTIER et al. 1965) permettant la pénétration du colorant.

Cette méthode largement utilisée dans l'étude de la relation anticorps-antigène (MOLLER 1964) est ici appliquée à l'étude de la relation lectine-site récepteur à la surface cellulaire.

b) Technique

La méthode que nous utiliserons est dérivée de la technique de INBAR et al. (1972) appliquée à des cellules tumorales.

1 ml de solution de lectine à différentes concentrations dans le milieu de EAGLE, est ajouté, dans une boite de Petri de 50 mm de diamètre à 1 ml de milieu de EAGLE dépourvu de sérum de veau foetal et contenant 2×10^6 cellules (fibroblastes d'embryon de poulet).

Après 1 heure d'incubation à 37°C, 2 ml de milieu de EAGLE contenant 20 % de sérum de veau foetal (10 % final) sont ajoutés dans chaque boite de culture, et les cellules sont incubées de nouveau à 37°C. Après 5 heures (fibroblastes d'embryon de poulet) de traitement par la lectine, les cellules sont recueillies et comptées. La différence entre le nombre de cellules

dans les cultures témoins et dans les cultures traitées par la lectine est utilisée comme critère pour la détermination de l'action toxique des lectines. En effet, la lyse cellulaire est une des actions cytotoxiques des lectines.

Quatre volumes de la solution à 2 % de bleu trypan dans l'eau distillée sont dilués dans un volume d'une solution de NaCl à 4,25 %, afin de la rendre isotonique ; ceci juste avant l'utilisation. Un volume de la solution isotonique de bleu trypan est ajouté à un volume de la suspension cellulaire. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'une pipette Pasteur iodée. La lecture se fait immédiatement sur une cellule de Malassez.

3. Efficacité d'adhésivité au substrat

La méthode utilisée est celle décrite par PAUL (1970).

Après 3 heures d'incubation à 37°C, les cultures de fibroblastes d'embryon de poulet sont lavées deux fois après élimination du milieu de culture. Les lavages sont effectués avec une solution de trypsine (0,05 % final) contenant de l'EDTA (0,02 % final). Après une incubation de 5 mm à 37°C, les cellules sont recueillies par pipetage dans le milieu de EAGLE contenant 10 % de sérum de veau foetal. Les cellules sont comptées en suspension.

Ces résultats sont vérifiés par comptage direct des cellules dans des boites de culture comportant un réticule de 2 mm de côté, après élimination du milieu de culture et addition de milieu neuf.

I. Déviation standard des résultats

Cette déviation standard ou écart absolu moyen "a", est calculée à partir de la formule suivante :

$$a = \frac{\sum (xi - \bar{x})}{n}$$

où "n" est le nombre total des expériences pour un point donné, et $\bar{x}$ la moyenne arithmétique des valeurs "xi" de la variable étudiée en ce point.

Chaque expérience est faite en double et répétée plusieurs fois.

Les résultats se rapportant à la croissance cellulaire sont l'expression de 14 expériences en moyenne. Les résultats varient de $\pm$ 4 % pour une même expérience, et de $\pm$ 7 % pour des expériences différentes.

Les expériences d'incorporation de thymidine tritiée en autoradiographie donnent des résultats qui varient de $\pm$ 3 % pour une même expérience et de $\pm$ 7 % pour des expériences différentes. Dans chaque cas 200 noyaux sont comptés

Les expériences d'incorporation d'uridine tritiée donnent des résultats variant de $\pm$ 1 % pour une même expérience et de $\pm$ 5 % pour des expériences différentes.

RESULTATS

RESULTATS

I - ACTION DES LECTINES SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE

A. Croissance cellulaire

Le nombre de cellules témoins et de cellules traitées par les lectines est déterminé après différents temps de culture. Les courbes de croissance des cellules non traitées sont établies à partir des résultats exposés dans le premier paragraphe et servent de référence pour les expériences ultérieures.

1. Croissance cellulaire en absence de lectines

Nous étudions les paramètres suivants : le mode de dissociation cellulaire, les conditions de culture (boite de Petri ou flacon Falcon) et la concentration cellulaire initiale.

a) Cellules hépatiques normales et tumorales de rat

Le mode de dissociation (tryptique ou mécanique) et les conditions de culture (boite de Petri de 50 mm de diamètre ou flacon Falcon de 25 cm^2 de surface) ne modifient pas la capacité de prolifération des cellules hépatiques normales (tableau III). La concentration cellulaire optimale est initialement de 1×10^6 cellules/ml et elle atteint sa valeur maximale après 48 heures de culture.

De même, les conditions de culture ne modifient pas la capacité de prolifération des cellules hépatiques tumorales de rat (ascite cancéreuse de ZAJDELA) ; après 6-7 heures de culture, le nombre de cellules atteint son maximum (tableau IV).

b) Cellules de rein de hamster nouveau-né BHK 21/C13 et BHK 21/Py

Les cellules BHK 21/C13 sont cultivées pendant 6 jours sans renouvellement de milieu. Dans ces conditions, le nombre de cellules atteint son maximum dès le 3ème jour de culture et celle-ci devient stationnaire entre le 3ème et le 4ème jour. Un renouvellement de milieu effectué après 48 heures de culture induit une croissance cellulaire plus importante que celle obtenue précédemment ; le nombre de cellules est maximum après 4 jours de culture.

Les cellules BHK 21/Py sont cultivées pendant 4 jours sans renouvellement

Tableau III

Comparaison de la croissance des cellules hépatiques normales de rat en fonction du temps de culture, selon le mode de dispersion (trypsique ou mécanique) et les conditions de culture (boite de Petri de 50 mm de diamètre ou flacon Falcon de 25 cm^2 de surface).
La concentration cellulaire est de 1 x 10^6 cellules/ml.

	Nombre de cellules x 10^6/ml		
mps en heures	Dissociation trypsique (0,25 %) Falcon 25 cm^2	Dissociation mécanique Falcon 25 cm^2	Dissociation mécanique Petri 50 mm ∅
24	2,0	3,2	2,2
48	5,5	5,8	5,2
72	5,2	5,6	5,2

Tableau IV

Comparaison de la croissance des cellules hépatiques tumorales de rat en fonction du temps de culture, selon les conditions de culture (boite de Petri de 50 mm de diamètre ou flacon Falcon de 25 cm^2 de surface)
La concentration cellulaire initiale est de 0,25 x 10^6 cellules/ml.

Temps en heures	Nombre de cellules x 10^6/ml	
	Falcon 25 cm^2	Petri 50 mm Ø
2	0,4	0,4
4	0,6	0,6
6	0,7	0,7
8	0,7	0,7

de milieu ; dans ces conditions, le nombre de cellules augmente régulièrement au cours du temps de culture. Avec un renouvellement de milieu effectué au temps 48 heures, le nombre de cellules après 4 jours de culture est plus élevé (48 x 10^6 cellules/ml) que celui observé en absence de renouvellement de milieu (2,5 x 10^6 cellules/ml). Cependant, dans les deux cas, au-delà de 4 jours de culture, les cellules se détachent du substrat, le pH diminue et les cellules meurent. Ces modifications sont liées à la grande capacité de prolifération des cellules. (Tableau V, fig. 2)

c) Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

Le mode de dissociation (trypsique ou mécanique), les conditions de culture (boite de Petri de 50 mm de diamètre, ou flacon Falcon de 25 cm^2 de surface) ne modifient pas le taux de prolifération cellulaire (tableau VI).

Au contraire, la concentration cellulaire initiale joue un rôle important dans la capacité de prolifération cellulaire (tableau VII). En effet, le temps de doublement de la population de fibroblastes d'embryon de 8 jours est de 12 heures dans le cas de cultures ensemencées avec 0,25 x 10^6 cellules/ml, et de 6 heures dans le cas de cultures ensemencées avec 0,50 x 10^6 cellules/ml.

Ainsi, pour des fibroblastes d'embryon d'un âge déterminé, le taux de prolifération dépend de la concentration cellulaire initiale.

Pour une même concentration cellulaire initiale (tableau VII), la capacité de prolifération cellulaire est plus importante pour les cellules provenant de jeunes embryons, que pour celles provenant d'embryons âgés (fig 3 a et 3 b).

2. Action des lectines à différentes concentrations sur la croissance cellulaire

Les lectines de Robinia, et de Dolichos ou la Concanavaline A sont ajoutées aux cultures à des concentrations finales variant de 0,001 à 100 µg/ml de milieu de culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution ou de stimulation par rapport au témoin rapporté à 100, après 24 heures de culture dans le cas des cellules BHK 21/C13 et BHK 21/Py et des fibroblastes d'embryon de poulet. Dans le cas des cellules hépatiques normales et tumorales de rat, les comptages sont respectivement effectués après 48 et 8 heures de culture.

a) cellules hépatiques normales et tumorales de rat

La lectine de Robinia, et la Concanavaline A à la concentration de 1 µg/ml ne modifient pas la croissance des cellules hépatiques normales et tumorales

Tableau V

Croissance comparée des cellules de rein de hamster nouveau-né normales (BHK 21/C13) et transformées par le virus du polyome (BHK 21/Py). Les coneentrations cellulaires initiales sont de $0,10 \times 10^6$ et $0,05 \times 10^6$ cellules/ml, respectivement pour les cellules BHK 21/C13 et BHK 21/Py. Dans le cas d'un renouvellement de milieu, celui-ci est effectué au 2ème jour de culture.

ps en ours	Nombre de cellules x 10^6/ml			
	BHK 21/C13		BHK 21/Py	
	sans renouvellement de milieu	avec renouvellement de milieu	sans renouvellement de milieu	avec renouvellement de milieu
1	0,2	0,2	0,2	0,2
2	0,6	0,6	0,5	0,5
3	1,7	1,9	1,7	1,8
4	1,7	3,1	2,5	4,8
5	1,6	2,8	-	-
6	1,6	2,8	-	-

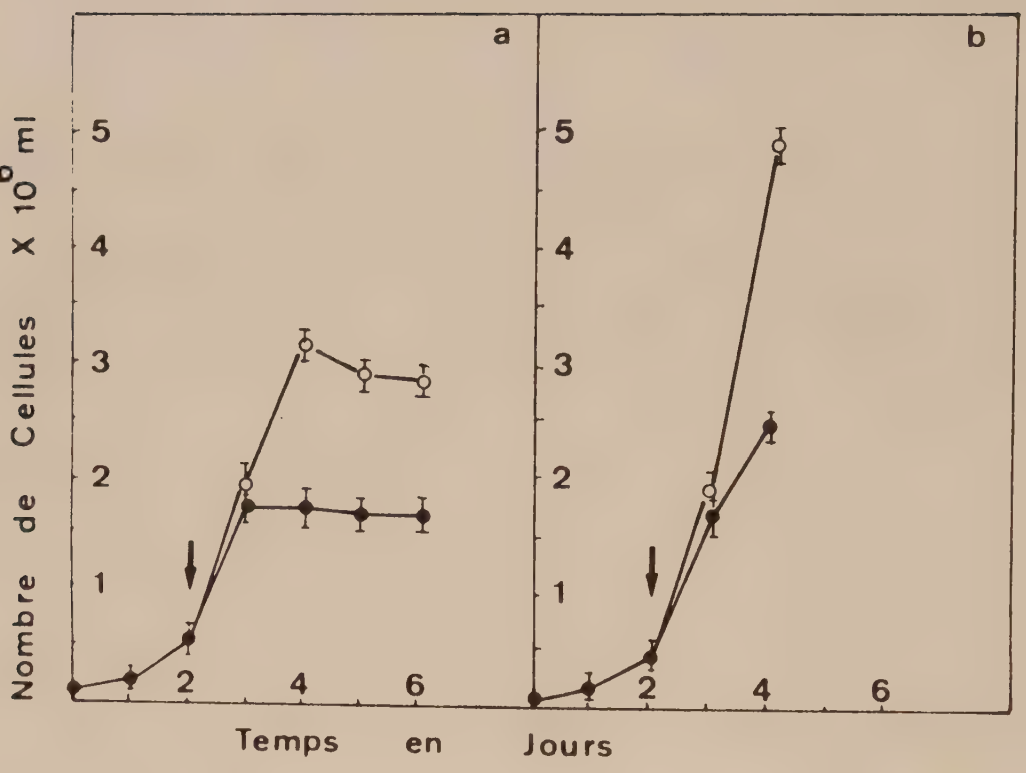


Figure 2 Croissance comparée des cellules de rein de hamster nouveau-né normales BHK 21/C13 (a) et transformées par le virus du polyome BHK 21/Py (b). Les concentrations cellulaires initiales sont de 0,10 x 10^6 et 0,05 x 10^6 cellules/ml, respectivement pour les cellules BHK 21/C13 et BHK 21/Py.
Les cellules sont cultivées sans renouvellement de milieu (●——●) et après un renouvellement de milieu (o——o). Dans le cas d'un renouvellement de milieu, celui-ci est effectué au 2ème jour de culture et indiqué par une flèche.

Tableau VI

Comparaison de la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement en fonction du mode de dispersion utilisé (trypsique ou mécanique). Les cultures sont réalisées en flacon Falcon de 25 cm^2 de surface et la concentration cellulaire initiale est de 0,25 x 10^6 cellules/ml.

ge de l'embryon en jours	Nombre de cellules x 10^6/ml après 72 heures de culture	
	Dissociation trypsique (0,25 %)	Dissociation mécanique
8	0,9	0,9
10	0,9	0,9
12	0,8	0,8
14	0,8	0,8
15	0,7	0,7
16	0,7	0,7
20	0,6	0,6

Tableau VII

Comparaison de la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement, en fonction de la concentration cellulaire initiale. Les cultures sont réalisées en boite de Petri de 50 mm de diamètre à partir de cellules obtenues par dissociation mécanique.

ge de l'embryon en jours	Nombre de cellules x 10^6/ml après 72 heures de culture	
	Co^* = 0,25 x 10^6/ml	Co^* = 0,5 x 10^6/ml
6	1,0	5,2
8	0,9	4,8
10	0,9	3,7
12	0,8	3,7
16	0,7	3,2

Co^* = Concentration cellulaire initiale.

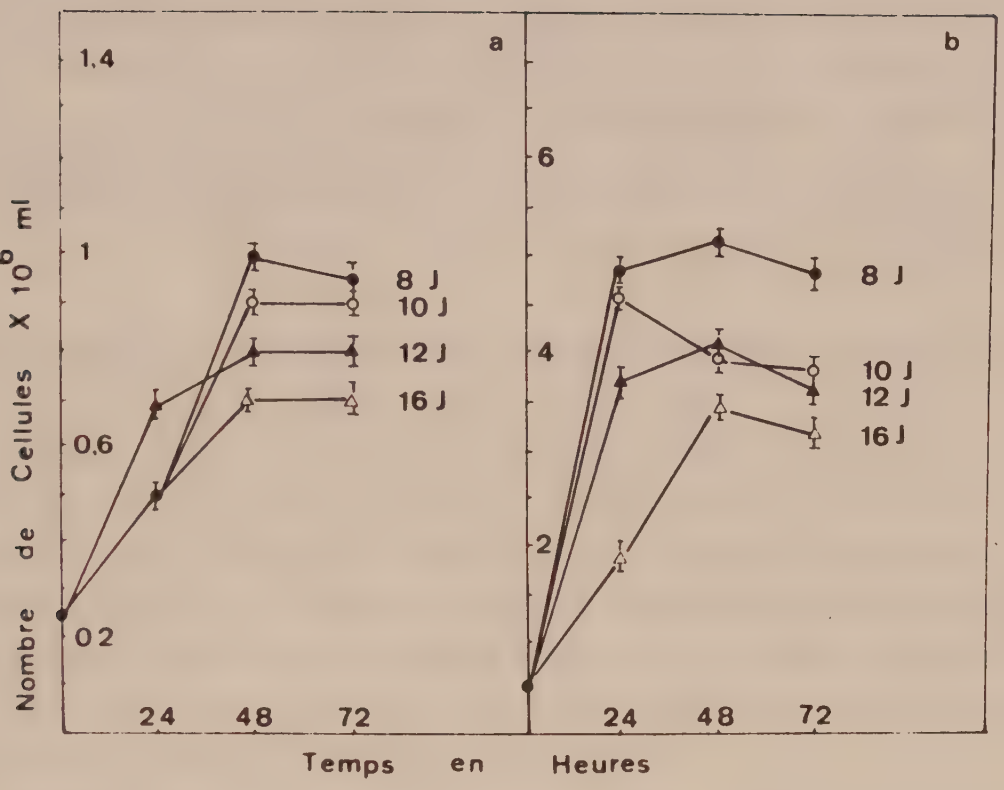


Figure 3 Comparaison de la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement, en fonction de la concentration cellulaire initiale qui est soit de 0,25 x 10^6 cellules/ml (a) soit de 0,50 x 10^6 cellules/ml (b). Les cultures sont réalisées en boites de Petri de 50 mm de diamètre à partir de cellules obtenues par dissociation mécanique.

(tableaux VIII et IX). Dans le cas des cellules hépatiques normales, la lectine de Robinia et la Concanavaline A stimulent la croissance cellulaire Pour une même lectine, cette stimulation est identique pour des concentrations variant de 3 à 50 µg/ml, elle est plus importante en présence de la lectine de Robinia qu'en présence de la Concanavaline A : 80 et 50 % respectivement (tableau VIII, fig. 4 a).

Dans le cas des cellules hépatiques tumorales, la lectine de Robinia, et la Concanavaline A diminuent la croissance cellulaire. L'action de ces deux lectines est ici identique pour des concentrations variant de 3 à 30 µg/ml. En présence de doses plus élevées de lectine, la diminution de la croissance cellulaire est plus prononcée (tableau IX, fig. 4b).

Aucune modification de la croissance des cellules hépatiques normales ou tumorales n'est induite par la lectine de Dolichos, même à la concentration de 100 µg/ml (tableaux VIII et IX, fig. 4a et 4b).

b) cellules de rein de hamster nouveau-né BHK 21/C13 et BHK 21/Py

L'action des lectines est étudiée d'une part sur les cultures en croissanc et d'autre part sur les cultures stationnaires. Dans le premier cas, les lectines sont ajoutées après 3 heures d'incubation et le nombre de cellules est déterminé après 24, 48 et 72 heures de culture ; dans le second cas, elles sont ajoutées après 3 jours de culture et le nombre de cellules est déterminé après 4, 5 et 6 jours pour les cellules BHK 21/C13 et après 4 jours pour les cellules BHK 21/Py.

La réponse des cellules BHK 21/C13 à différentes concentrations de lectine est complexe car il apparait des différences très nettes selon la lectine et l'état de la culture (culture en croissance ou culture stationnaire). Ainsi, est-il nécessaire d'étudier chaque cas en détail selon la lectine.

La Concanavaline A induit un maximum de stimulation (42 %) dans les cultures stationnaires, à la concentration de 1 µg/ml. Par contre, dans les cultures en croissance, le maximum de stimulation (25 %) est obtenu pour la concentration de 0,1 µg/ml ; cette stimulation significative est moins importante que dans le cas précédent. Dans les deux cas, la Concanavaline A induit à fortes concentrations (100 µg/ml) une agglutination importante des cellules en culture, ce qui pourrait expliquer le nombre plus faible de cellules. En effet, il est très difficile de compter les cellules au sein d'un aggrégat.

La lectine de Robinia et la lectine de Dolichos induisent un maximum de stimulation (35 et 50 % respectivement) dans le cas de cultures en

Tableau VIII

Action des lectines à différentes concentrations sur la croissance des cellules hépatiques normales de rat, dissociées mécaniquement, après 72 heures de culture. La concentration cellulaire initiale est de 1 x 10^6 cellules/ml.

	Nombre de cellules x 10^6/ml		
Lectine µg/ml	lectine de Robinia	Concanavaline A	Lectine de Dolichos
0	5,0	5,0	5,0
1	5,2	5,4	-
3	9,0	7,2	5,1
6	9,4	7,4	-
12	9,2	7,6	-
30	8,8	6,4	-
50	8,8	6,8	-
100	8,6	6,6	5,2

Tableau IX

Action des lectines à différentes concentrations sur la croissance des cellules hépatiques tumorales de rat, après 8 heures de culture. La concentration cellulaire initiale est de 0,25 x 10^6 cellules/ml

µg/ml	Nombre de cellules x 10^6/ml		
	Lectine de Robinia	Concanavaline A	Lectine de Dolichos
0	0,70	0,70	0,70
1	0,71	0,70	-
3	0,25	0,25	0,70
6	0,22	0,25	-
10	0,22	0,22	-
30	0,20	0,20	-
50	0,18	0,15	-
100	0,20	0,15	0,70

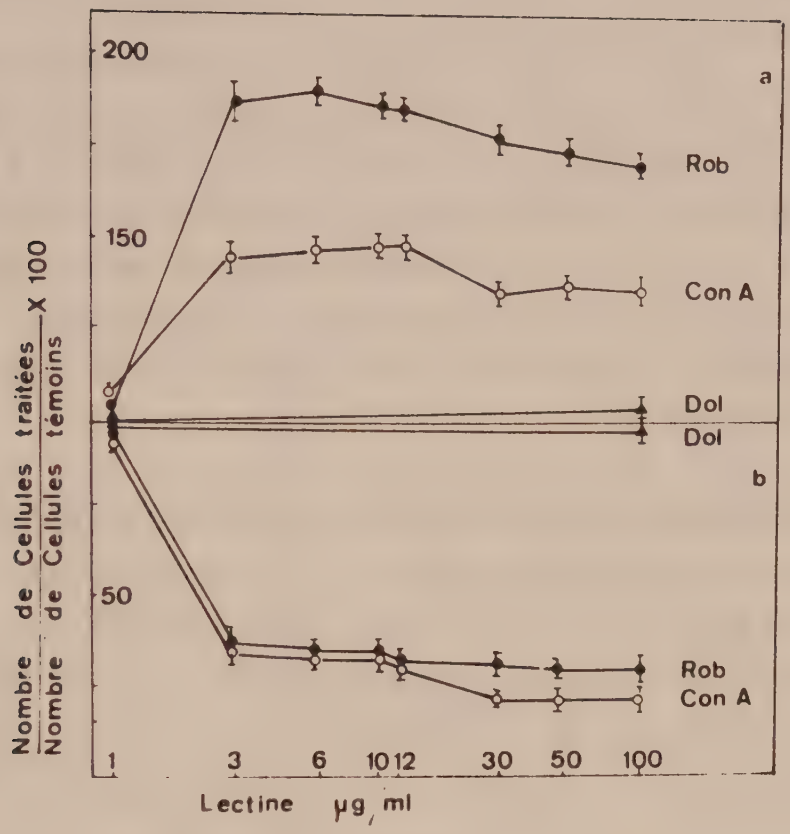


Figure 4 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A), à différentes concentrations, sur la croissance des cellules hépatiques normales (a) et tumorales (b) de rat, respectivement après 72 et 8 heures de culture. Le témoin est rapporté à 100. Les concentrations de lectines qui varient de 1 à 100 µg/ml sont représentées en échelle logarithmique à base 10.

croissance. Ce maximum de stimulation est atteint en présence de 1 µg de lectine/ml, au delà de cette concentration, le pourcentage de stimulation diminue (tableau X, fig 5a, 5b, et 5c).

Les lectines à des concentrations variant de 0,1 à 100 µg/ml diminuent la croissance des cellules BHK 21/Py. Cette diminution est observée quelle que soit la lectine et quel que soit l'état de la culture : en croissance ou stationnaire (tableau XI, fig. 5a, 5b, et 5c).

Ainsi, dans le cas des cellules BHK 21/C13 et BHK 21/Py, les trois lectines étudiées sont actives ; il existe de plus une concentration de lectine pour laquelle la réponse des cellules BHK 21/C13 est maximale. L'intensité de la réponse cellulaire est moins importante au-deçà et au-delà de cette concentration ; la réponse cellulaire peut être nulle et même inversée comme cela est observé pour une concentration de 100 µg de Concanavaline A. Cependant, il faut rappeler l'influence de l'agglutination dans ce dernier cas.

c) Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

A des concentrations variant de 3 à 100 µg/ml, les lectines ont une action identique sur les cellules provenant d'embryons d'un âge donné. La croissance des fibroblastes provenant de jeunes embryons est diminuée de 44 et 40 % respectivement pour les cellules de 8- et de 10-jours. Aucune modification significative de la croissance cellulaire n'est observée dans les cultures de fibroblastes de 12-jours. La croissance des fibroblastes de 16-jours est stimulée. Il est à noter qu'en présence de 100 µg/ml, cette stimulation est moins importante de 15 % que celle observée en présence de 3 ou 10 µg/ml.

Aucune modification de la prolifération cellulaire n'est observée dans les cultures traitées par 1 µg de lectine/ml, quel que soit le stade de développement des embryons d'où proviennent les cellules (Tableau XII, fig 6 a, 6 b et 6 c).

3. Action des lectines sur la croissance cellulaire en fonction du temps de culture.

Les lectines de Robinia, de Dolichos ou la Concanavaline A sont ajoutées à la concentration finale de 3 µg/ml du milieu de culture, sauf dans le cas des cellules BHK 21/C13 et BHK 21/Py où cette concentration est de 1 µg/ml.

a) Cellules hépatiques normales et tumorales de rat

La croissance des cellules hépatiques normales est stimulée sous l'action

Tableau X

Action des lectines à différentes concentrations sur la croissance des cellules de rein de hamster nouveau-né normales (BHK 21/C13), après 24 heures de traitement. Les concentrations cellulaires initiales sont respectivement de $0,1 \times 10^6$ et $1,9 \times 10^6$ cellules/ml pour les cultures en croissance et les cultures stationnaires.

Lectines µg/ml	Nombre de cellules x 10^6 / ml Cultures en croissance	Cultures stationnaires
0	0,20	3,10
Concanavaline A		
0.001	0,20	-
0.01	0,24	-
0.1	0,25	3,60
1	0,15	4,40
10	0,15	3,90
100	0,15	3,00
Lectines de Robinia		
0.1	0,25	3,10
1	0,26	3,70
10	0,25	3,50
100	0,25	3,00
Lectines de Dolichos		
0.1	0,20	3,40
1	0,30	3,30
10	0,30	3,50
100	0,25	2,80

Dans les cultures en croissance, la lectine est ajoutée après 3 heures d'incubation, et le nombre de cellules est évalué après 24 heures de culture avec la lectine.

Dans les cultures stationnaires, la lectine est ajoutée après 3 jours de culture, et le nombre de cellules est évalué après 24 heures de culture avec la lectine.

Tableau XI

Action des lectines à différentes concentrations sur la croissance des cellules de rein de hamster nouveau-né transformées par le virus du polyome (BHK 21/Py) après 24 heures de traitement. Les concentrations cellulaires sont respectivement de 0,05 x 10^6 et 1,80 x 10^6 cellules/ml pour les cultures en croissance et les cultures stationnaires.

Lectines µg/ml	Nombre de cellules x 10^6 / ml	
	Culture en croissance	Cultures stationnaires
0	0,20	4,80
Concanavaline A		
0.1	0,13	3,80
1	0,13	3,30
10	0,15-	3,40
100	0,16	4,70
Lectine de Robinia		
0.1	0,13	3,70
1	0,13-	3,10
10	0,15	3,20
100	0,15	1,60
Lectine de Dolichos		
0.1	0,15	3,40
1	0,15	3,30
10	0,15	3,40
100	0,15	2,80

Dans les cultures en croissance, la lectine est ajoutée après 3 heures d'incubation, et le nombre de cellules est évalué après 24 heures de culture avec la lectine.

Dans les cultures stationnaires, la lectine est ajouté après 3 jours de culture et le nombre de cellules est évalué après 24 heures de culture avec la lectine.

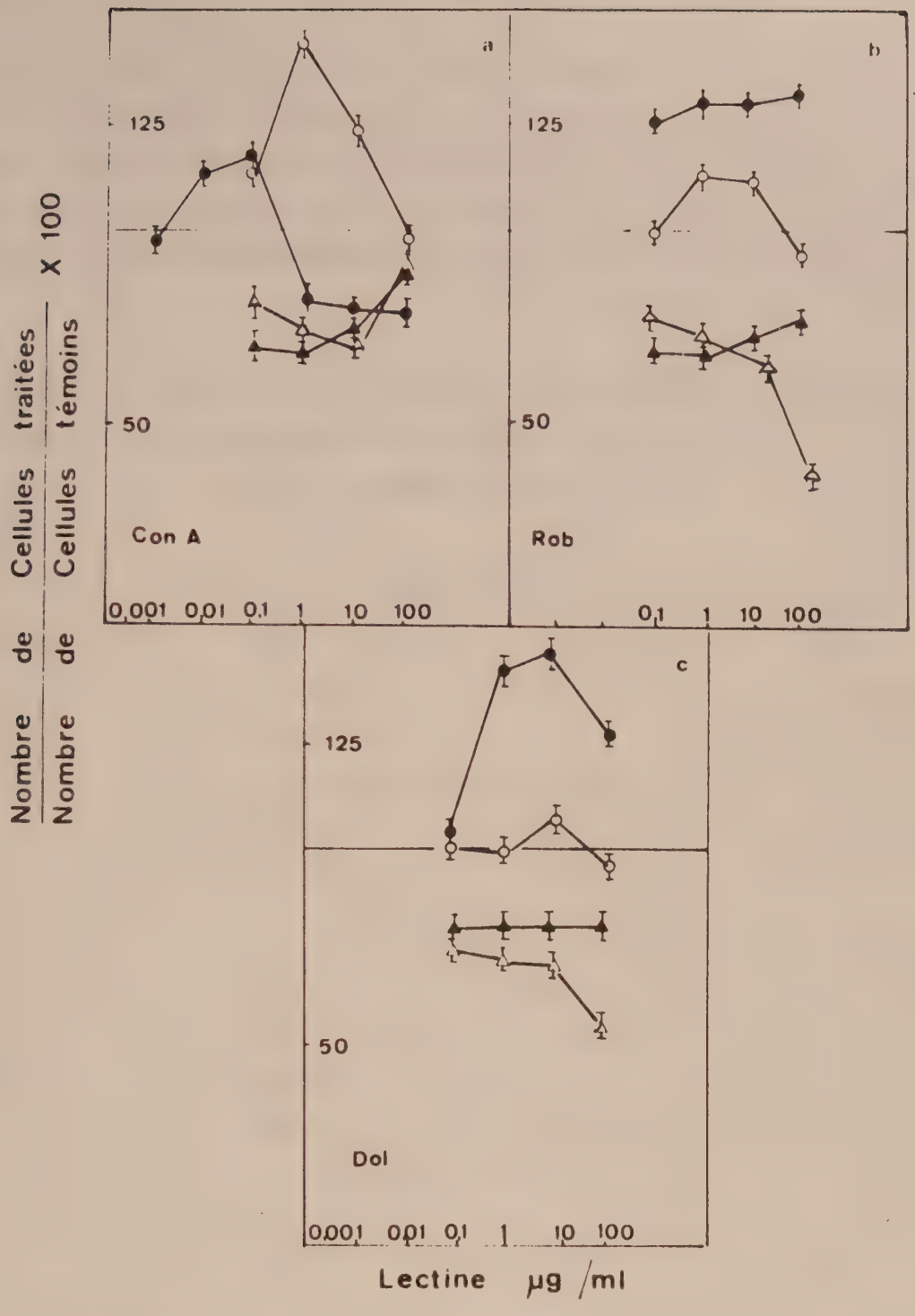


Figure 5 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A), à différentes concentrations, sur la croissance des cellules de rein de hamster normales BHK 21/C13 en culture en croissance (●——●) et en culture stationnaire (○——○) ainsi que sur la croissance des cellules transformées par le virus du polyome BHK 21/Py en culture en croissance (▲——▲) et en culture stationnaire (△——△) après 24 heures de traitement.
Dans les cultures en croissance, la lectine est ajoutée après 3 heures d'incubation, et le nombre de cellules est évalué après 24 heures de culture avec la lectine. Dans les cultures stationnaires, la lectine est ajoutée après 3 jours de culture, et le nombre de cellules est évalué après 24 heures de culture avec la lectine.
Le témoin est rapporté à 100.
Les concentrations des lectines qui varient de 0,001 à 100 µg/ml sont représentées en échelle logarithmique à base 10.

Tableau XII

Action des lectines à différentes concentrations sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement. Les cellules sont obtenues par dissociation mécanique, et le nombre de cellules est déterminé après 24 heures de culture. La concentration cellulaire initiale est de 0,5 x 10^6 cellules/ml.

ctines µg/ml	Nombre de cellules x 10^6/ml après 24 h de culture Age de l'embryon en jours			
	8	10	12	16
Témoin	4,8	4,5	3,7	1,9
Lectine de Robinia				
1	4,7	4,3	3,6	2,0
3	2,7	2,8	3,7	2,5
10	2,7	2,7	3,8	2,5
100	2,7	2,7	3,6	2,4
Lectine de Dolichos				
1	4,6	4,0	3,1	2,1
3	2,7	2,8	3,8	2,5
10	2,6	2,7	3,9	2,4
100	2,6	2,6	3,9	2,3
Concanavaline A				
1	4,7	4,3	3,8	2,2
3	2,7	2,9	3,7	2,5
10	2,7	2,8	3,7	2,5
100	2,7	2,7	3,7	2,5

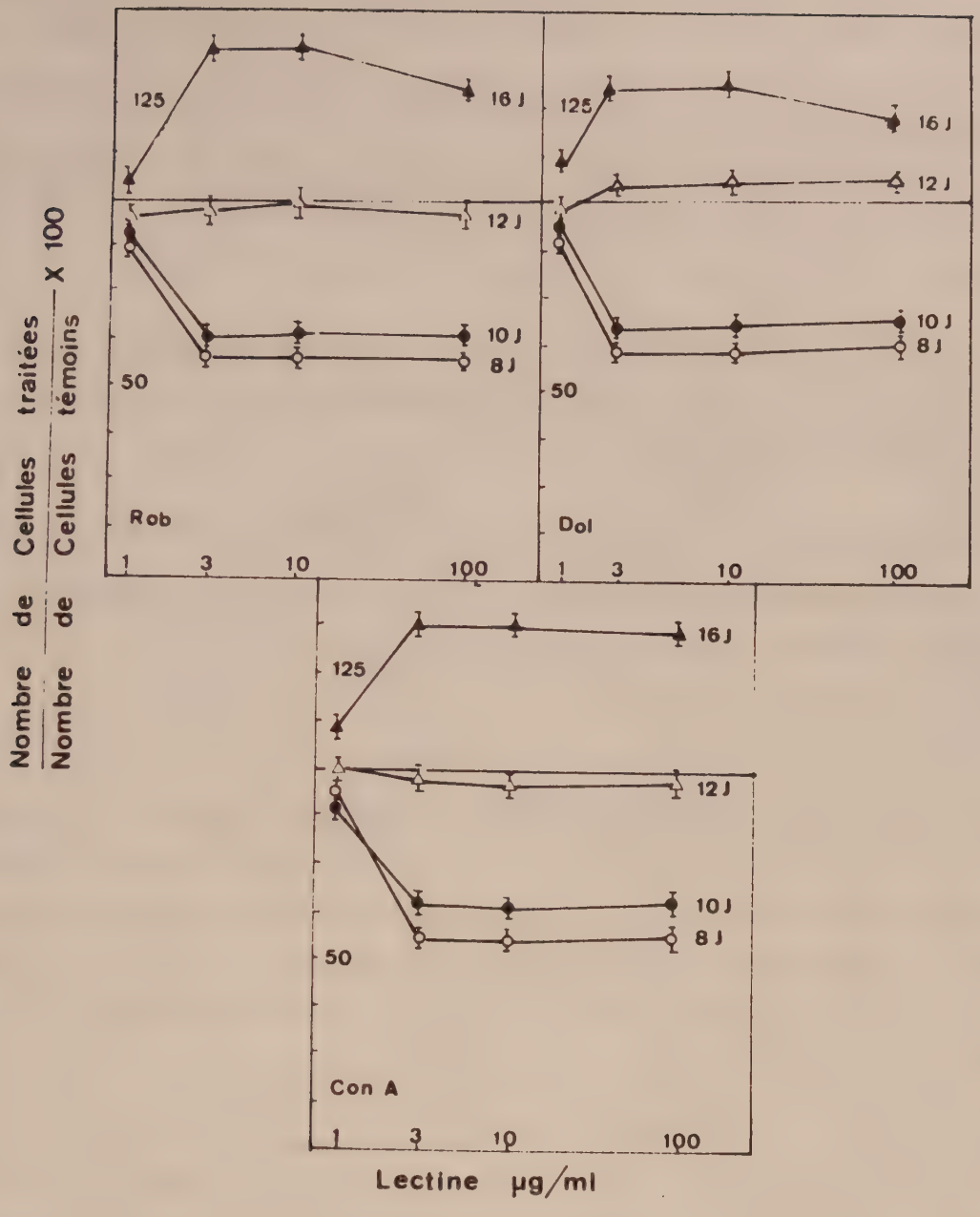


Figure 6 Action des lectines de Robinia (a), de Dolichos (b) et de la Concanavaline A (c), à différentes concentrations, sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement après 24 heures de culture. Le témoin est rapporté à 100. Les concentrations de lectines qui varient de 1 à 100 µg/ml, sont représentées en échelle logarithmique à base 10.

de la lectine de Robinia et de la Concanavaline A. Cette stimulation est significative à partir de la 48ème heure de culture et se maintient après 72 heures. (78 à 80 % : lectine de Robinia, et 42 à 44 % : Concanavaline A). (tableau XIII, fig 7).

La croissance des cellules hépatiques tumorales est diminuée par la lectine de Robinia et la Concanavaline A. Cette diminution est significative à partir de la 4ème heure de culture, et atteint 64 % après 8 heures de culture (tableau XIV, fig 8).

Par contre, quel que soit le type de cellules hépatiques, la lectine de Dolichos ne provoque pas de changement de la croissance cellulaire (tableaux XIII et XIV, fig. 7 et 8).

b) cellules de rein de hamster nouveau-né : BHK 21/C13 et BHK 21/Py

Dans le cas des cellules BHK 21/C13, les lectines de Robinia et de Dolichos stimulent la croissance cellulaire dans les cultures en croissance. Cette stimulation est significative dès la 24ème heure de culture et atteint un maximum après 72 heures. La Concanavaline A induit une stimulation, précédée pendant 24 heures d'une diminution faible mais significative de la croissance cellulaire ; cette stimulation est maximale après 72 heures de culture (47 %).

Dans le cas de cultures stationnaires, les trois lectines testées induisent une stimulation de la croissance cellulaire, cette stimulation est plus importante en présence de la Concanavaline A (42 %) qu'en présence de la lectine de Robinia (20 %) ou de la lectine de Dolichos (10 %) (tableau XV, fig 9a et 9b).

Dans le cas des cellules BHK 21/Py, la croissance cellulaire est diminuée sous l'action des lectines. Cette diminution atteint 47, 35 et 35 %, après 72 heures de culture, respectivement en présence de la Concanavaline A, des lectines de Robinia et de Dolichos ajoutées à des cultures en croissance.

Ajoutées à des cultures stationnaires, les lectines induisent aussi une diminution de la croissance cellulaire de 33 à 35 % (tableau XVI, fig 9 c et 9d)

c) Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

Les fibroblastes de jeunes embryons (6 à 10 jours) en culture ont une croissance diminuée par les lectines. Cette diminution est significative dès la 24ème heure de culture (Tableau XVII, fig 10 a et 10 b). Aucune différence significative n'est observée entre la croissance des fibroblastes d'embryon de 12 jours traités par les lectines et ceux non traités, quelle que soit la lectine et quel que soit le temps de culture (Tableau XVII ,

Tableau XIII

Action des lectines sur la croissance des cellules hépatiques normales de rat, en fonction du temps de culture. Les cellules sont obtenues par dissociation mécanique. La concentration cellulaire initiale est de 1 x 10^6 cellules/ml

	Nombre de cellules x 10^6/ml			
Temps en heures	Témoin	Lectine de Robinia (3 µg/ml)	Concanavaline A (3 µg/ml)	Lectine de Dolichos (3 µg/ml)
24	2,4	2,6	2,4	2,3
48	5,2	9,2	7,4	5,5
72	5,0	9,0	7,2	5,0

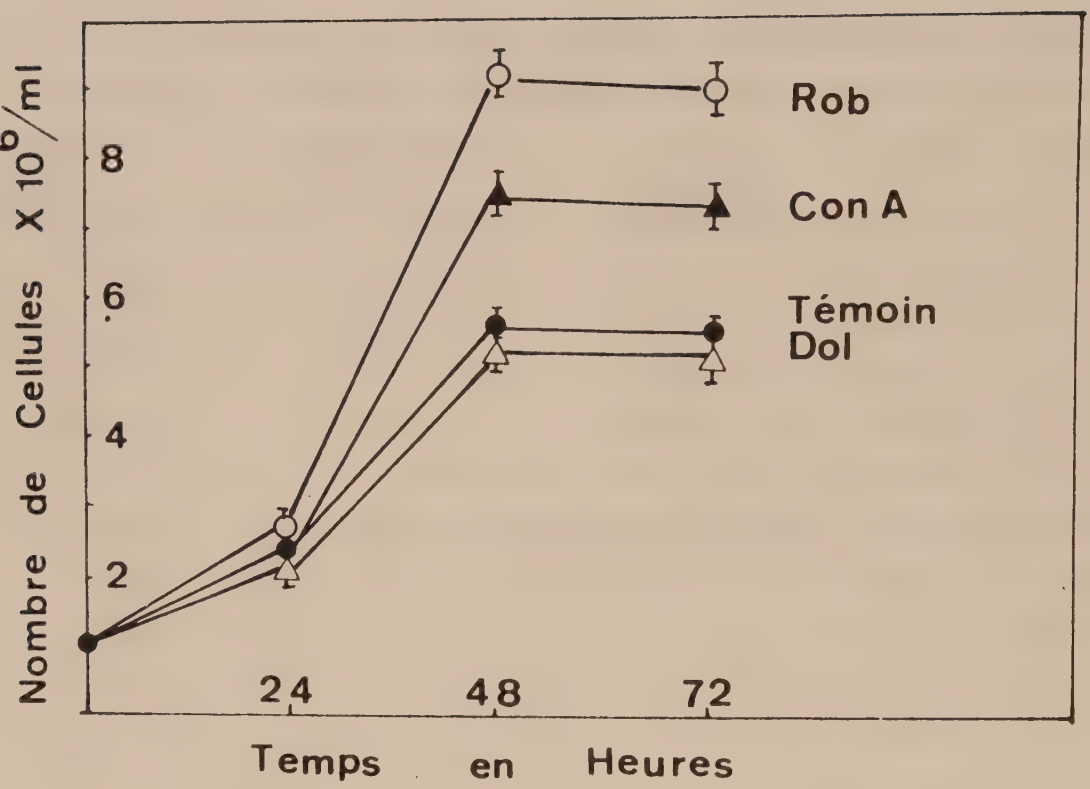


Figure 7 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A), en fonction du temps de culture, sur la croissance des cellules hépatiques normales de rat. Les cellules sont obtenues par dissociation mécanique. La concentration cellulaire initiale est de 1×10^6 cellules/ml.

Tableau XIV

Action des lectines sur la croissance des cellules hépatiques tumorales de rat, en fonction du temps de culture. La concentration cellulaire initiale est de 0,25 x 10^6 cellules/ml

Temps en heures	Nombre de cellules x 10^6/ml			
	Témoin	Lectine de Robinia (3 µg/ml)	Lectine de Dolichos (3 µg/ml)	Concanavaline A (3 µg/ml)
2	0,40	0,40	0,40	0,40
4	0,60	0,40	0,60	0,40
6	0,70	0,30	0,70	0,30
8	0,70	0,25	0,70	0,25

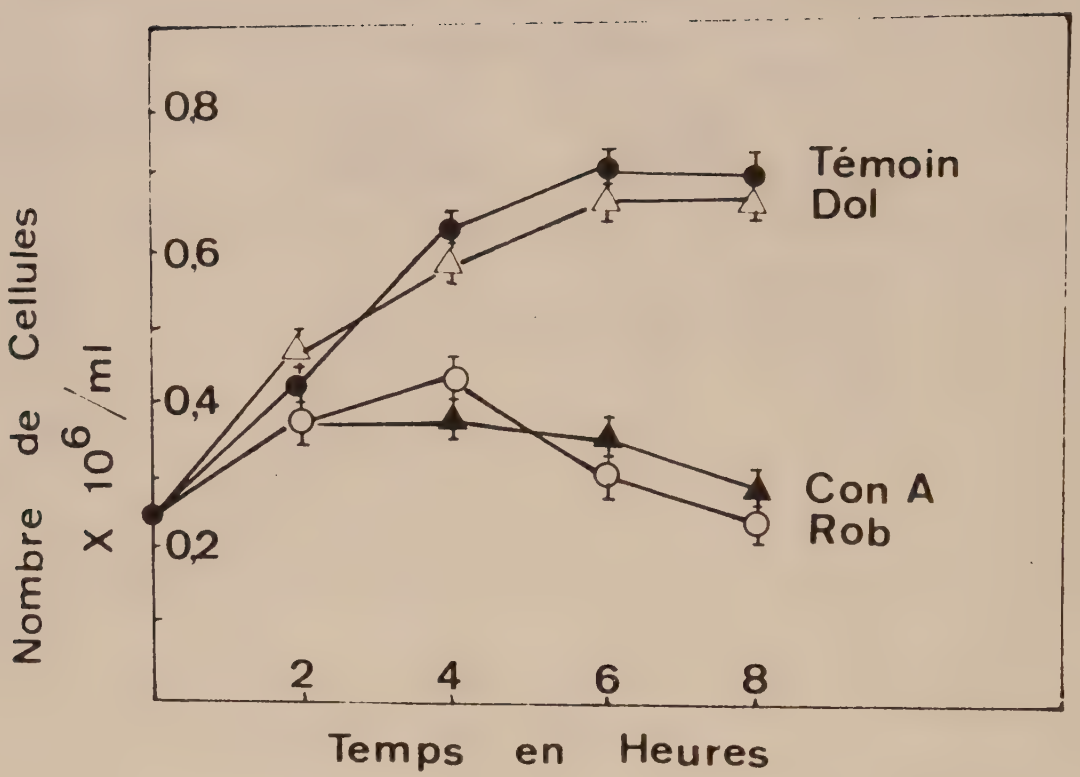


Figure 8 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A), en fonction du temps de culture, sur la croissance des cellules hépatiques tumorales de rat. La concentration cellulaire initiale est de 0,25 x 10^6 cellules/ml.

Tableau XV

Action des lectines sur la croissance des cellules de rein de hamster nouveau-né normales (BHK 21/C13), en fonction du temps de culture. Les concentrations cellulaires initiales sont respectivement de $0,1 \times 10^6$ et $1,9 \times 10^6$ cellules/ml dans les cultures en croissance et dans les cultures stationnaires.

Temps en jours	Nombre de cellules x 10^6/ml			
	Témoin	Lectine de Robinia (1 µg/ml)	lectine de Dolichos (1 µg/ml)	Concanavaline A (1 µg/ml)
Cultures en croissance				
1	0,20	0,26	0,30	0,15
2	0,60	1,40	0,90	0,70
3	1,70	3,40	2,30	2,50
Cultures stationnaires				
1	3,1	3,70	3,30	4,40
2	2,8	4,10	3,30	4,20
3	2,8	3,70	3,10	3,90

Dans les cultures en croissance, la lectine est ajoutée après 3 heures d'incubation, et le nombre de cellules est évalué après 1, 2 et 3 jours de culture avec la lectine. Dans les cultures stationnaires, la lectine est ajoutée après 3 jours de culture, et le nombre de cellules est évalué après 1, 2 et 3 jours de culture avec la lectine.

Tableau XVI

Action des lectines sur la croissance des cellules de rein de hamster nouveau-né transformées par le virus du polyome (BHK 21/Py) en fonction du temps de culture. Les concentrations cellulaires initiales sont respectivement de $0,05 \times 10^6$ et $1,80 \times 10^6$ cellules/ml dans les cultures en croissance et dans les cultures stationnaires.

Temps en jours	Nombre de cellules x 10^6/culture			
	Témoin	Lectine de Robinia (1 µg/ml)	lectine de Dolichos (1 µg/ml)	Concanavaline A (1 µg/ml)
Cultures en croissance				
1	0,20	0,13	0,15	0,13
2	0,50	0,40	0,40	0,40
3	1,70	0,90	1,10	1,10
Cultures stationnaires				
1	4,80	3,10	3,30	3,30

Dans les cultures en croissance, la lectine est ajoutée après 3 heures d'incubation, et le nombre de cellules est évalué après 1, 2 et 3 jours de culture avec la lectine. Dans les cultures stationnaires, la lectine est ajoutée après 3 jours de culture, et le nombre de cellule est évalué après 1 jour de culture avec la lectine.

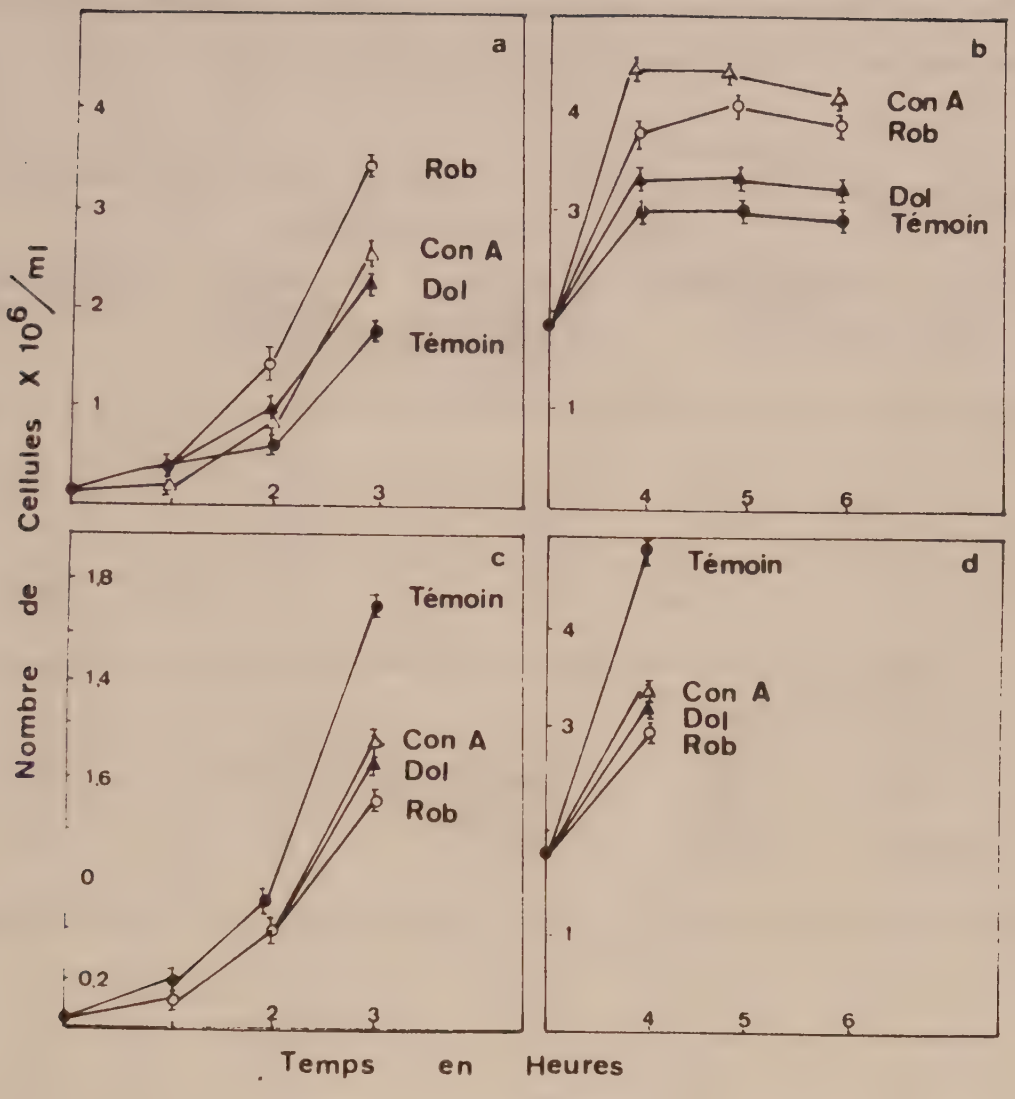


Figure 9 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A) en fonction du temps de culture, sur la croissance des cellules de rein de hamster nouveau-né normales BHK 21/C13 en culture en croissance (a) et en culture stationnaire (b) ainsi que sur la croissance des cellules transformées par le virus du polyome BHK 21/Py en culture en croissance (c) et en culture stationnaire (d).
Dans les cultures en croissance, la lectine est ajoutée après 3 heures d'incubation. Dans les cultures stationnaires, la lectine est ajoutée après 3 jours de culture. Les concentrations cellulaires initiales sont respectivement de 0,1 x 10^6 et de 1,9 x 10^6 cellules/ml pour les cellules BHK 21/C13 en culture en croissance et en culture stationnaire. Les concentrations cellulaires initiales sont respectivement de 0,05 x 10^6 et de 1,8 x 10^6 cellules/ml pour les cellules BHK 21/Py en culture en croissance et en culture stationnaire.

Tableau XVII

Action des lectines sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement, en fonction du temps de culture. Les cellules sont obtenues par dissociation mécanique. La concentration cellulaire initiale est de 0,5 x 10^6 cellules/ml.

Temps en heures	Age de l'embryon	Nombre de cellules x 10^6/ml Témoin	Lectine de Robinia (3 µg/ml)	lectine de Dolichos (3 µg/ml)	Concanavaline A (3 µg/ml)
24	6	5,0	-	2,8	-
	8	4,8	2,7	2,7	2,7
	10	4,5	2,8	2,8	2,9
	12	3,7	3,7	3,8	3,7
	16	1,9	2,5	2,5	2,5
48	6	5,4	-	2,3	-
	8	5,1	2,2	2,2	2,1
	10	3,9	2,5	2,2	2,5
	12	4,1	4,0	3,8	4,1
	16	3,5	4,7	4,0	4,7
72	6	5,2	-	2,2	-
	8	5,0	2,2	2,1	2,2
	10	3,7	2,4	1,9	2,4
	12	3,8	3,7	3,6	3,7
	16	3,4	4,2	3,7	4,5

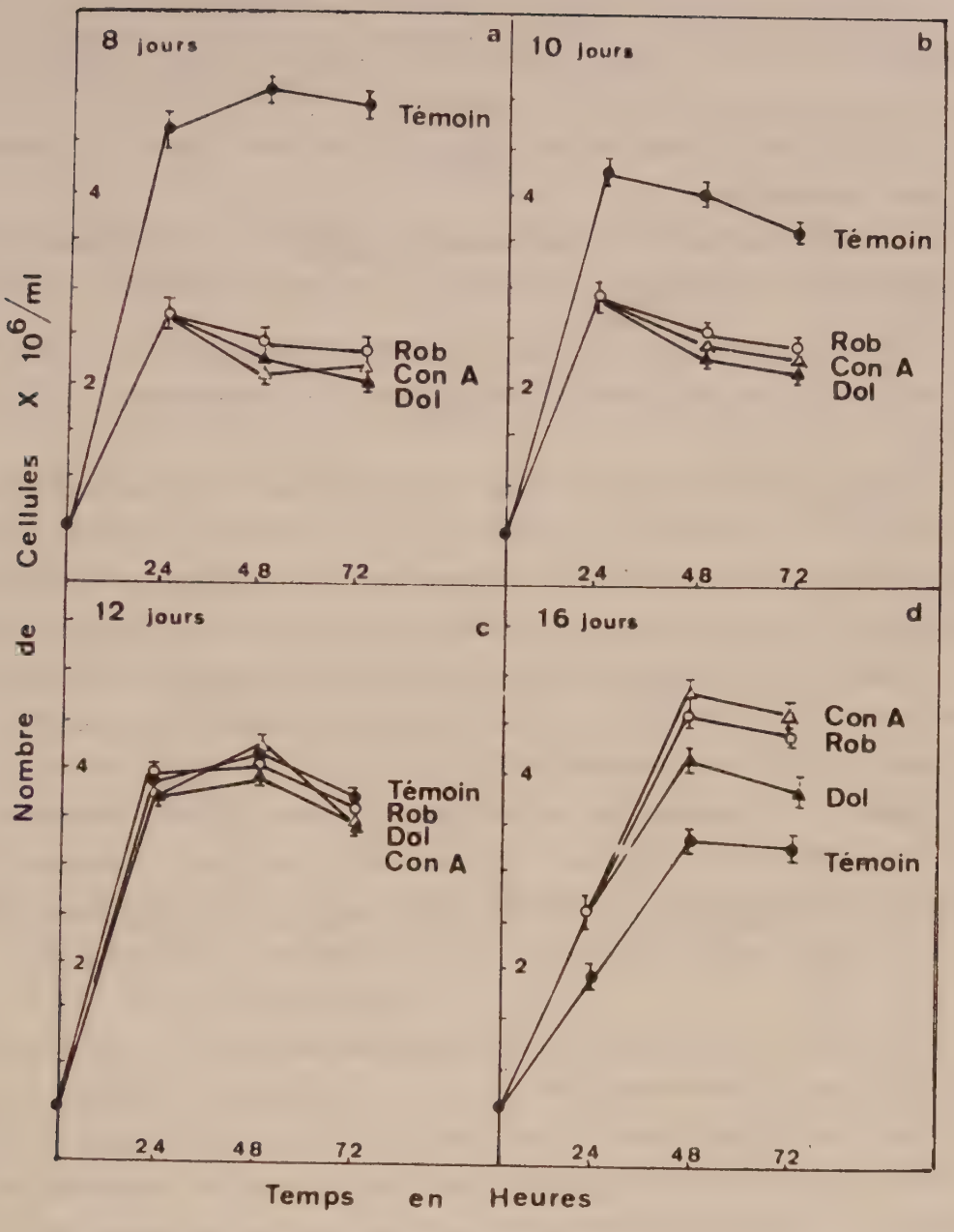


Figure 10 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A), en fonction du temps de culture, sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement. Les cellules sont obtenues par dissociation mécanique. La concentration cellulaire initiale est de 0,5 x 10^6 cellules/ml.

fig 10 C). Par contre, la croissance des fibroblastes d'embryon de 16 jours est stimulée par les lectines. Cette stimulation est significative dès la 24ème heure de culture, et se maintient au-delà (Tableau XVII , fig 10 d).

Les trois lectines testées induisent une modification de la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet, qu'il s'agisse des lectines aspécifiques comme la lectine de Robinia et la Concanavaline A, ou de lectine spécifique comme la lectine de Dolichos dépourvue d'action mitogénique vis à vis des lymphocytes.

La modification de la croissance in vitro des fibroblastes d'embryon de poulet dépend de l'âge de l'embryon d'où proviennent les cellules.

Dans les expériences ci-dessus, l'action des lectines a été déterminée sur des fibroblastes dissociés mécaniquement et ensemencés à $0,5 \times 10^6$ cellules/ml.

Lorsque les fibroblastes sont dissociés par la trypsine et ensemencés à $0,25 \times 10^6$ cellules/ml, les mêmes types de réponse cellulaire aux lectines sont obtenus (tableau XVIII) : diminution de la croissance cellulaire des fibroblastes de jeunes embryons, absence de réponse des fibroblastes d'embryon de 12 jours et stimulation de la croissance cellulaire des fibroblastes d'embryon de 16 jours (fig 11). La trypsine modifie les propriétés de surface des cellules (MOSCONA 1971), cependant, il a été montré par des expériences d'incorporation de glucides radioactifs une resynthèse complète du glycolemme en 10-12 heures. Ceci pourrait expliquer l'absence d'influence du mode de dispersion des cellules dans l'action des lectines, celle-ci n'étant significative qu'à partir de la 24ème heure de culture.

A la lumière des résultats précédemment exposés, il apparait que la lectine de Robinia et la Concanavaline A sont actives sur les différents types de cellules étudiés sauf dans le cas des fibroblastes d'embryon de 12 jours. De même, si la lectine de Dolichos est active sur les fibroblastes de jeunes embryons et d'embryons plus âgés ainsi que sur les cellules BHK 21/C13 et BHK 21/Py, elle reste inactive sur les fibroblastes d'embryon de 12 jours.

L'action des lectines sur la croissance des différents types cellulaires étudiés est résumée dans le tableau XIX.

La concentration cellulaire initiale étant différente pour chaque type cellulaire, la quantité de lectine active est rapportée à un même nombre de cellules (tableau XX). Des différences de sensibilité aux lectines sont alors observées.

Tableau XVIII

Comparaison de la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement, traités par les lectines, en fonction du mode de dispersion (trypsique ou mécanique) utilisé. La concentration cellulaire initiale est de 0,25 x 10^6 cellules/ml.

Âge de l'embryon en jours	Nombre de cellules x 10^6/ml après 72 h de culture					
	Témoin		lectine de Robinia (3 µg/ml)		Concanavaline A (3 µg/ml)	
	t	m	t	m	t	m
8	0,9	0,9	0,3	0,3	0,3	0,3
10	0,9	0,9	0,3	0,3	0,3	0,3
12	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
14	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8	0,8
15	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8
16	0,7	0,7	0,9	0,9	0,9	0,9
18	0,6	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8
20	0,6	0,6	0,8	0,8	0,8	0,8

t : dispersion trypsique
m : " mécanique.

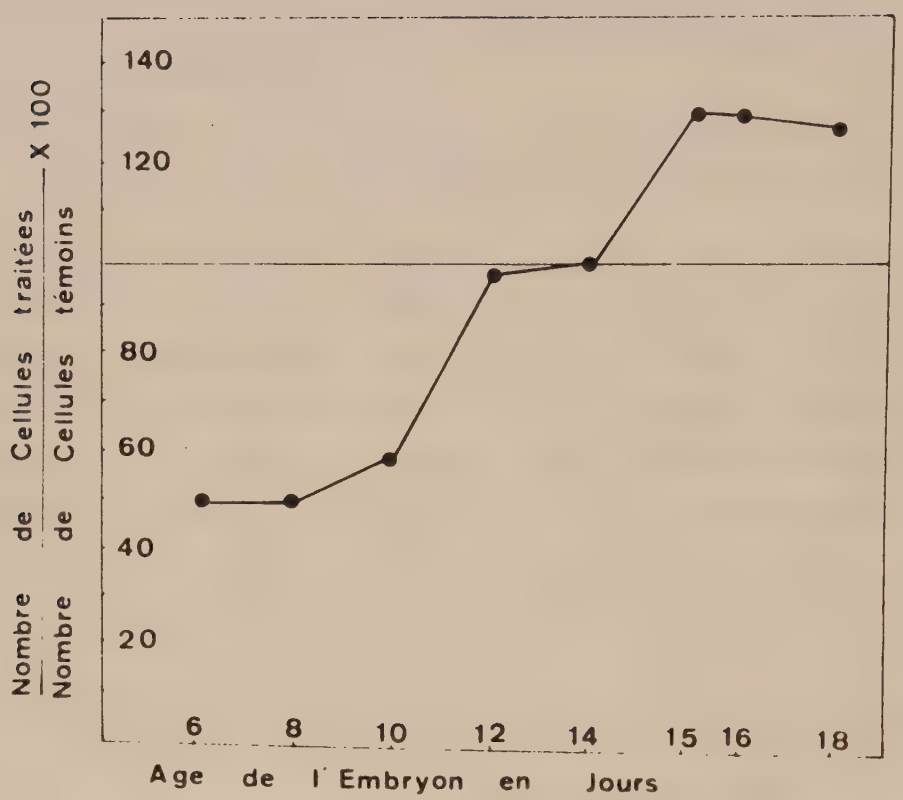


Figure 11 Action des lectines, en fonction du stade de développement embryonnaire, sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet après 72 heures de culture. Les cellules sont obtenues par dissociation trypsique. Le témoin est rapporté à 100.

Tableau XIX

Comparaison de l'action des lectines sur la croissance des différents types de cellules.

Type de cellules	Concentration cellulaire initiale	lectine de Robinia	Concanavaline A	lectine de Dolichos
Fibroblastes d'embryon de poulet jeunes (8-10 j) (primoculture)	0,5 x 10^6 cellules/ml (adhèrent)	-	-	-
Fibroblastes d'embryon de poulet de 12 jours (primoculture)	"	0	0	0
Fîbroblastes d'embryon de poulet âgés (16 jours) (primoculture)	"	+	+	+
Cellules hépatiques normales de rat (primoculture)	1 x 10^6 cellules/ml (adhèrent)	+	+	0
Cellules hépatiques tumorales de rat (primoculture)	0,25 x 10^6 cellules/ml (n'adhèrent pas)	-	-	0
Cellules BHK 21 en culture en croissance (lignée)	0,1 x 10^6 cellules/ml (adhèrent)	+	+	+
Cellules BHK 21 en culture stationnaire (lignée)	2,1 x 10^6 cellules/ml (adhèrent)	+	+	+
Cellules BHK 21/Py en culture en croissance (lignée)	0,05 x 10^6 cellules/ml (adhèrent)	-	-	-
Cellules BHK 21/Py en culture stationnaire (lignée)	1,8 x 10^6 cellules/ml (adhèrent)	-	-	-

+ : Stimulation de la croissance cellulaire

- : diminution de la croissance cellulaire

0 : pas de modification de la croissance cellulaire

Tableau XX

Comparaison de la concentration optimum de lectine, induisant une modification de la croissance cellulaire, rapportée à un nombre identique de cellules (1×10^6)

Type cellulaire	Coneentration optimum de lectine µg/ml	Concentration de lectine pour 1×10^6 cellules
Fibroblastes d'embryon de poulet 8-10 jours	3	6
Fibroblastes d'embryon de poulet 16 jours	3	6
Cellules hépatiques normales de rat	3	3
Cellules hépatiques tumorales de rat	3	12
Cellules BHK 21		
Culture en croissance	0.1	1 (Concanavaline A)
	1	10 (Robinia et Dolichos)
Culture stationnaire	10	5 (Dolichos)
	1	0,5 (Robinia et Concanavaline A)
Cellules BHK 21/Py*		
Culture en croissance	1	20
Culture stationnaire	1	0,5

•La concentration optimum est identique pour les trois lectines, excepté dans le cas des cellules BHK 21.

B - Morphologie des cellules traitées par les lectines

Les cellules sont colorées au Giemsa, et observées en microscopie photonique.

1. Cellules hépatiques normales et tumorales de rat

Les cellules hépatiques normales de rat adhèrent au substrat ; ce sont des cellules de type épithélial, de forme pentagonale dont le noyau volumineux contient souvent deux nucléoles. Leur volume mesuré au Coulter Counter est de 4500 μ^3 (ZILHART, communication personnelle).

Les cellules hépatiques tumorales de rat n'adhèrent pas au substrat ; ce sont des cellules arrondies dont le volume est compris entre 2000 et 2500 μ^3 (CORNIC 1975).

Ces propriétés morphologiques ne sont pas modifiées par les lectines.

2. Cellules de rein de hamster nouveau-né : BHK 21/C13 et BHK 21/Py

Les cellules sont de type fibroblastiques. Leur volume est de 1100 à 1200 μ^3 (O'NEILL, communication personnelle). Les cellules normales BHK 21/C13 se multiplient *in vitro* sans se chevaucher, contrairement aux cellules transformées BHK 21/Py. Planche 1a, 1b, 3.

Les lectines ne modifient pas ces caractéristiques, excepté à la concentration de 100 µg/ml. A cette concentration, les cellules traitées se détachent du substrat et adhèrent fortement les unes aux autres, en prenant une forme arrondie. Planche 4a, 4b.

3. Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

Les cellules adhèrent au substrat ; ce sont des cellules allongées en culture et qui perdent cette forme allongée une fois détachées du substrat. Leur volume est compris entre 1000 et 1100 μ^3 (CORNIC 1973). Planche 2.

C.- Action des lectines sur l'incorporation de thymidine tritiée

L'activité de synthèse de l'ADN est rapportée à l'incorporation d'un précurseur radioactif : la thymidine tritiée. Cette incorporation est évaluée par autoradiographie après 48 et 8 heures de culture, respectivement pour les cellules hépatiques normales et tumorales, et après 24 heures de culture pour les fibroblastes d'embryon de poulet, et les cellules BHK 21/C13 et BHK 21/Py.

Planche *

1) Cellules normales de rein de hamster nouveau-né (BHK 21/C13) :

   1a - après 72 heures de culture, cellules à confluence

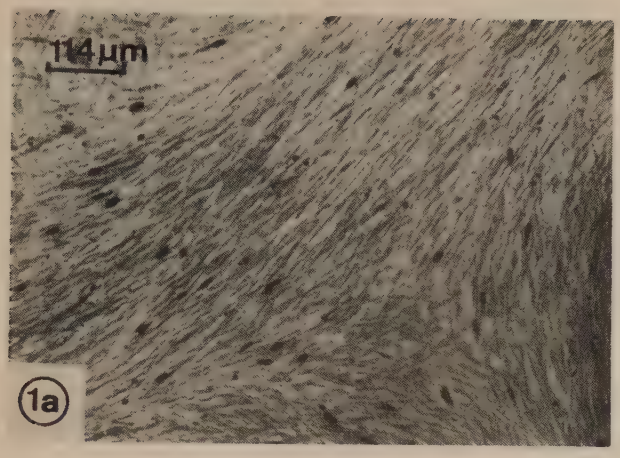
   1b - après 24 heures de culture.

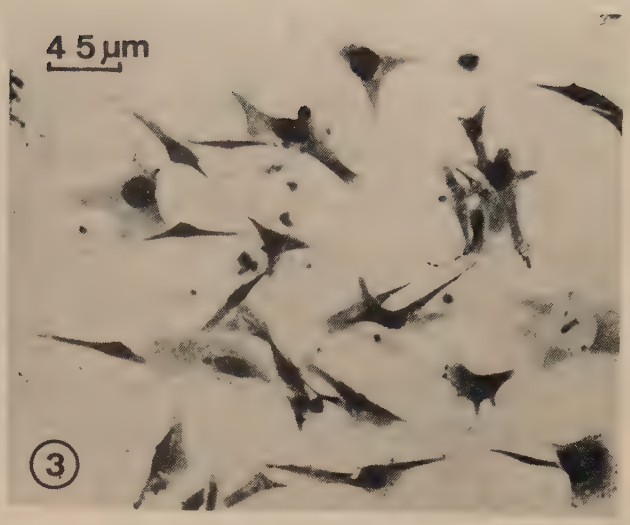
2) Fibroblastes d'embryon de poulet âgé de 10 jours : primoculture de 48 heures.

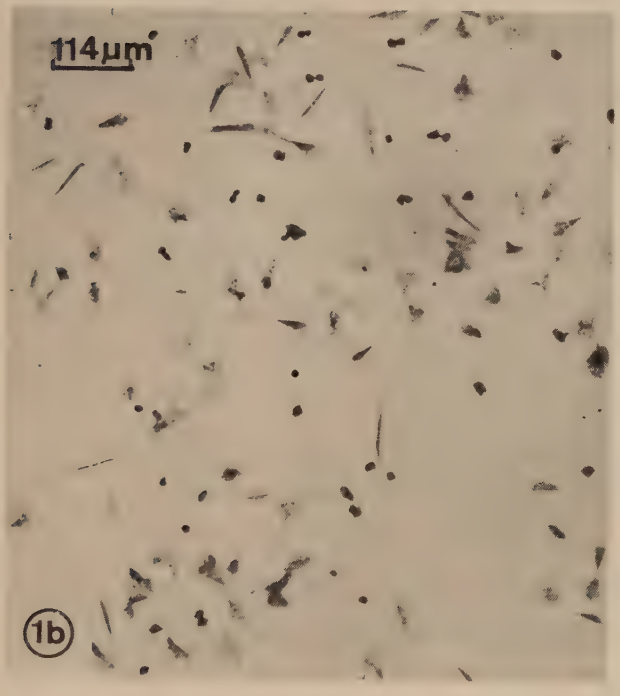
3) Cellules de rein de hamster nouveau-né transformées par le virus du polyome (BHK 21 /Py) : après 24 heures de culture.

4) Cellules normales de rein de hamster nouveau-né (BHK 21/C13) après 72 heures de culture : aspect des agrégats (a et b) induits par la Concanavaline A à la concentration de 100 µg/ml.

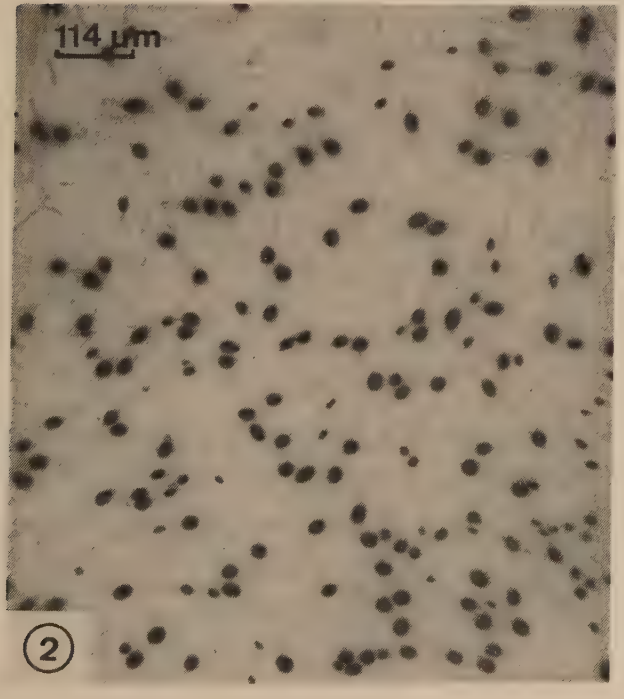
* Les cellules sont traitées pour l'autoradiographie comme indiqué dans le chapitre Matériels et Méthodes, colorées au giemsa.


114 µm
1a


4 5 µm
3


114 µm
1b

114 µm
4a


114 µm
2

114 µm
4b

1. Action des lectines à différentes concentrations sur l'incorporation de thymidine tritiée.

Les lectines de Robinia , de Dolichos ou la Concanavaline A sont ajoutées aux cultures à des concentrations finales variant de 0,001 à 100 µg/ml. L'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules témoins et les cellules traitées par les lectines est déterminée par le pourcentage des noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement (index de marquage).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de stimulation ou de diminution de l'incorporation de thymidine tritiée par rapport au témoin rapporté à 100.

a) Cellules hépatiques normales et tumorales de rat

Dans le cas des cellules hépatiques normales, aucune incorporation de thymidine tritiée n'a été observée dans les conditions expérimentales décrites. Différentes concentrations de thymidine tritiée ont été testées, à des temps variables de culture, en marquage long ou court (pulse) ; les résultats se sont révélés négatifs. Cependant, la thymidine devant être phosphorylée avant incorporation dans l' ADN, il est possible qu'elle n'ait pû être utilisée par absence d'activité de la thymidine kinase. Cette déficience a été en effet observée dans certains types de cellules, leucémiques en particulier (SEED, 1965).

Dans le cas des cellules hépatiques tumorales, la lectine de Robinia et la Concanavaline A, à des concentrations variant de 3 à 10 µg/ml induisent une diminution de 48 % de l'incorporation de thymidine tritiée. A des concentrations de lectine plus élevées, cette diminution est plus prononcée (tableau XXI, fig 12). Par contre, la lectine de Dolichos n'induit pas de modification de l'incorporation de thymidine tritiée, même à la concentration de 100 µg/ml (tableau XXI, fig 12).

b) Cellules de rein de hamster nouveau-né : BHK 21/C13 et BHK 21/Py

Dans le cas des cellules BHK 21/C13, la réponse cellulaire aux lectines est complexe et dépend de la concentration de lectine ; il s'avère nécessaire d'étudier chaque cas en détail selon la lectine.

Ajoutée à des cultures stationnaires, la Concanavaline A à la concentration de 1 µg/ml induit un maximum de stimulation de 80 % de l'incorporation de thymidine tritiée, tandis que les lectines de Robinia et de Dolichos à la

TABLEAU XXI

Action des lectines à différentes concentrations sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat après 6 heures de culture. La thymidine est ajoutée pendant 1 heure. Les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement : index de marquage

Lectine µg/ml	Index de marquage
0	27,4
Concanavaline A	
1	27,2
3	14,2
10	14,1
100	13,9
Lectine de Robinia	
1	27,2
3	14,2
10	14,2
100	13,9
Lectine de Dolichos	
3	27,5
100	27,4

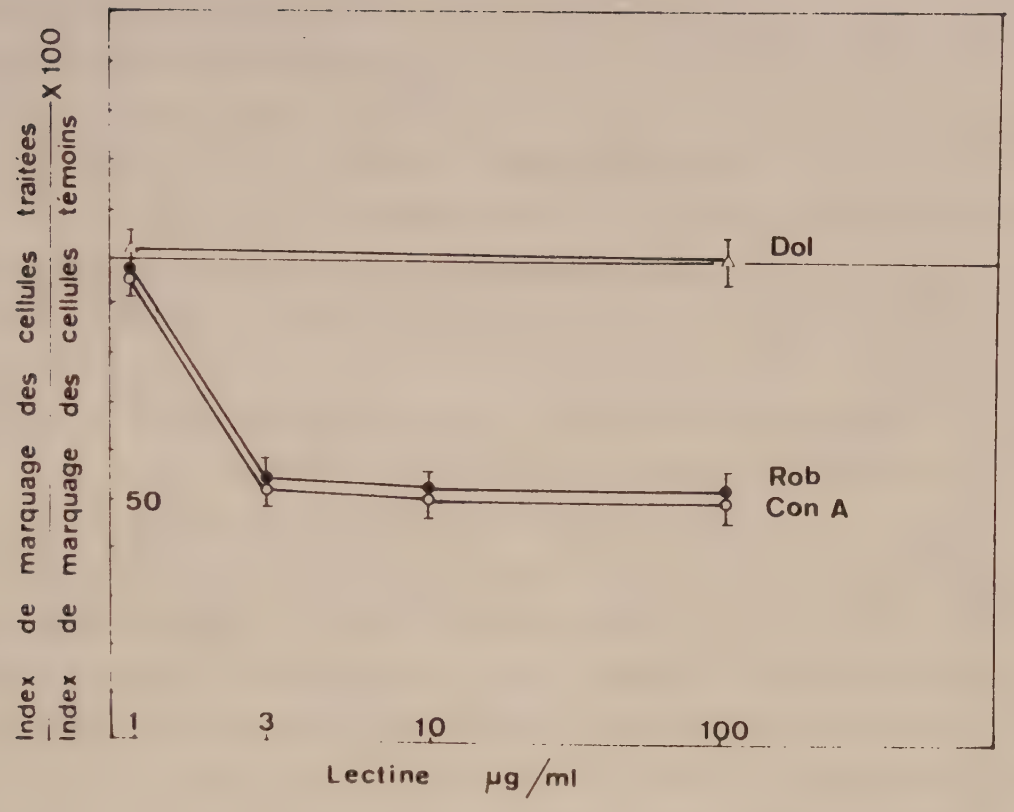


Figure 12 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A) à différentes concentrations, sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat après 6 heures de culture. L'index de marquage est le nombre de noyaux marqués par rapport au nombre de noyaux totaux pour une heure de traitement.
Le témoin est rapporté à 100.
Les concentrations de lectine qui varient de 1 à 100 µg/ml sont représentées en échelle logarithmique à base 10.

concentration de 0,1 µg/ml, induisent une stimulation maximale de 13 % (tableau XXII, fig 13a et 13 b).

Ajoutées à des cultures en croissance, les lectines de Robinia (à 1 µg/ml) et de Dolichos (à 10 µg/ml) induisent respectivement une stimulation maximale de 257 et 222 %. Le maximum de stimulation (69 %) induite par la Concanavaline A est obtenue pour une concentration de 0,1 µg/ml (tableau XXII, fig 13a et 13b). A des concentrations plus élevées, la Concanavaline A induit une agglutination des cellules, ce qui pourrait expliquer la diminution de l'incorporation de thymidine tritiée observée dans ce cas. En effet, il est très difficile de compter les noyaux marqués au sein d'un agrégat.

Dans le cas des cellules BHK 21/Py, les lectines de Robinia, de Dolichos et la Concanavaline A diminuent l'incorporation de thymidine tritiée (tableau XXIII, fig 13 c et 13 d).
Selon la concentration de lectine, cette diminution varie de 20 à 30 % pour les cultures en croissance et les cultures stationnaires.

Ainsi, les modifications par les lectines de l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules BHK 21/C13 et BHK 21/Py sont comparables à celles obtenues au cours de la croissance des cellules. Certaines différences sont cependant observées, notamment dans l'intensité de la réponse cellulaire. Pour un même type de cellules et dans les mêmes conditions expérimentales, la concentration de lectine qui induit un effet maximum, diffère pour la croissance en nombre des cellules et pour l'incorporation de thymidine tritiée. La différence observée traduirait un décalage dans le temps de l'effet des lectines sur ces deux paramètres.

c) fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

A la concentration de 1 µg/ml, les lectines de Robinia, de Dolichos et la Concanavaline A ne modifient pas l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement (tableau XXIV, fig 14 a, 14b et 14c).

A des concentrations variant de 3 à 100 µg/ml, les lectines diminuent l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes de jeunes embryons Cette diminution est de 66-67 % pour les cellules de 8 jours et de 38-44 % pour les cellules de 10 jours. Aucune modification significative de l'incorporation de thymidine tritiée n'est observée dans les fibroblastes d'embryons de 12 jours. Par contre, les lectines stimulent l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryons de 16 jours. Cette stimulation est de 31 % pour la lectine de Robinia, de 24 % pour la lectine de Dolichos

Tableau XXII

Action des lectines à différentes concentrations sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules de rein de hamster nouveau-né normales BHK 21/C13 après 24 heures de culture. La thymidine tritiée est ajoutée pendant 4 heures (cultures en croissance) ou 24 heures (cultures stationnaires). Les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement : index de marquage.

Lectine µg/ml	Index de marquage	
	Culture en croissance	Culture stationnaire
0	4,9	1,5
ncanavaline A		
0.001	5,4	-
0,01	8,1	-
0.1	8,3	2,1
1	3,4	2,7
10	0,9	2,7
100	0,5	1,6
ctine de Robinia		
0.1	11,4	1,7
1	17,5	1,6
10	11,9	1,5
100	11,5	1,4
ctine de Dolichos		
0.1	5,6	1,7
1	14,3	1,6
10	15,8	1,5
100	10,3	1,5

Dans le cas de culture en croissance, la lectine est ajoutée après 3 heures d'incubation et l'index de marquage est évalué après 24 heures de culture avec la lectine.

Dans le cas de culture stationnaire, la lectine est ajoutée après 3 jours de culture et l'index de marquage est évalué après 24 heures de culture avec la lectine.

Tableau XXIII

Action des lectines à différentes concentrations sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules de rein de hamster nouveau-né transformées par le virus du polyome BHK 21/Py après 24 heures de culture. La thymidine tritiée est ajoutée pendant 4 heures (culture en croissance) ou pendant 24 heures (culture stationnaire). Les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement : index de marquage.

Lectine µg/ml	Index de marquage	
	Culture en croissance	Culture stationnaire
0	18,1	4,0
Concanavaline A		
0.1	11,6	3,1
1	12,0	2,9
10	13,5	2,8
100	14,0	2,8
Lectine de Robinia		
0.1	12,5	3,2
1	12,6	2,9
10	13,0	2,9
100	13,1	2,9
Lectine de Dolichos		
0.1	14,8	3,1
1	14,8	3,0
10	14,6	3,1
100	11,4	3,3

Dans le cas de culture en croissance, la lectine est ajoutée après 3 heures d'incubation et l'index de marquage est évalué après 24 heures de culture avec la lectine. Dans le cas de culture stationnaire, la lectine est ajoutée après 3 jours de culture et l'index de marquage est évalué après 24 heures de culture avec la lectine.

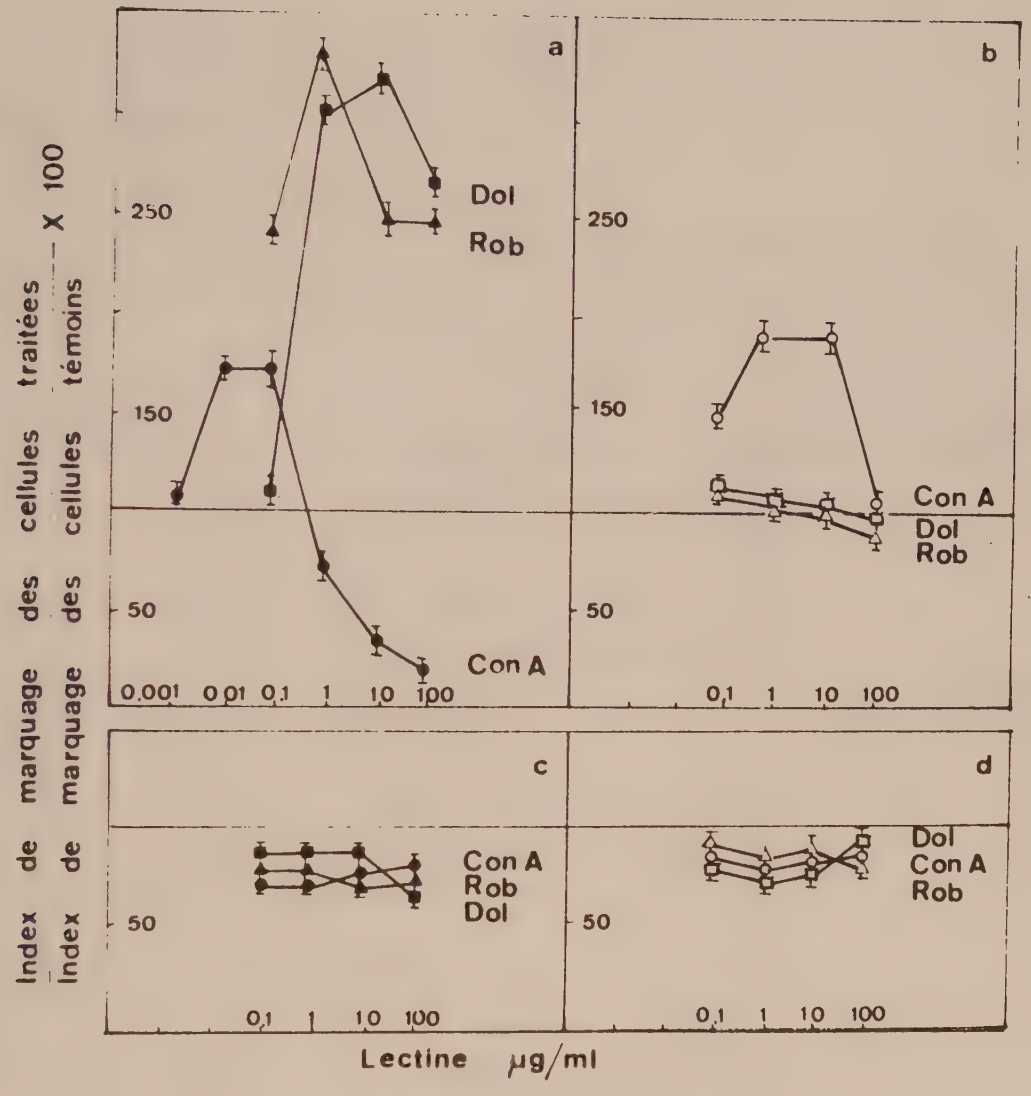


Figure 13 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A), à différentes concentrations, sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules de rein de hamster nouveau-né normales BHK 21/C13 en culture en croissance (a) et en culture stationnaire (b) ainsi que dans les cellules transformées par le virus du polyome BHK 21/Py en culture en croissance (c) et en culture stationnaire (d), après 24 heures.
L'index de marquage est le nombre de noyaux marqués par rapport au nombre de noyaux totaux pour 1 heure de traitement. Le témoin est rapporté à 100.
Les concentrations de lectine qui varient de 0,001 à 100 µg/ml sont représentées en échelle logarithmique à base 10.

Tableau XXIV

Action des lectines à différentes concentrations sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement, après 24 heures de culture. La thymidine tritiée est ajoutée à la 20ème heure. Les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement : index de marquage.

Lectine µg/ml	Index de marquage après 24 heures de culture Age de l'embryon en jours			
	8	10	12	16
Témoin	23,7	14,4	7,8	7,6
Lectine de Robinia				
1	23,2	14,0	8,1	7,8
3	8,1	9,0	8,0	10,0
10	8,0	8,9	8,0	10,0
100	7,6	8,8	7,9	8,9
Lectine de Dolichos				
1	22,9	13,1	7,9	7,2
3	7,9	8,1	7,9	9,4
10	7,8	7,5	7,9	9,4
100	7,5	7,5	8,1	8,9
Concanavaline A				
1	22,5	13,6	8,1	7,8
3	7,9	8,1	8,1	9,8
10	7,9	7,6	7,9	9,8
100	7,5	7,5	7,9	8,8

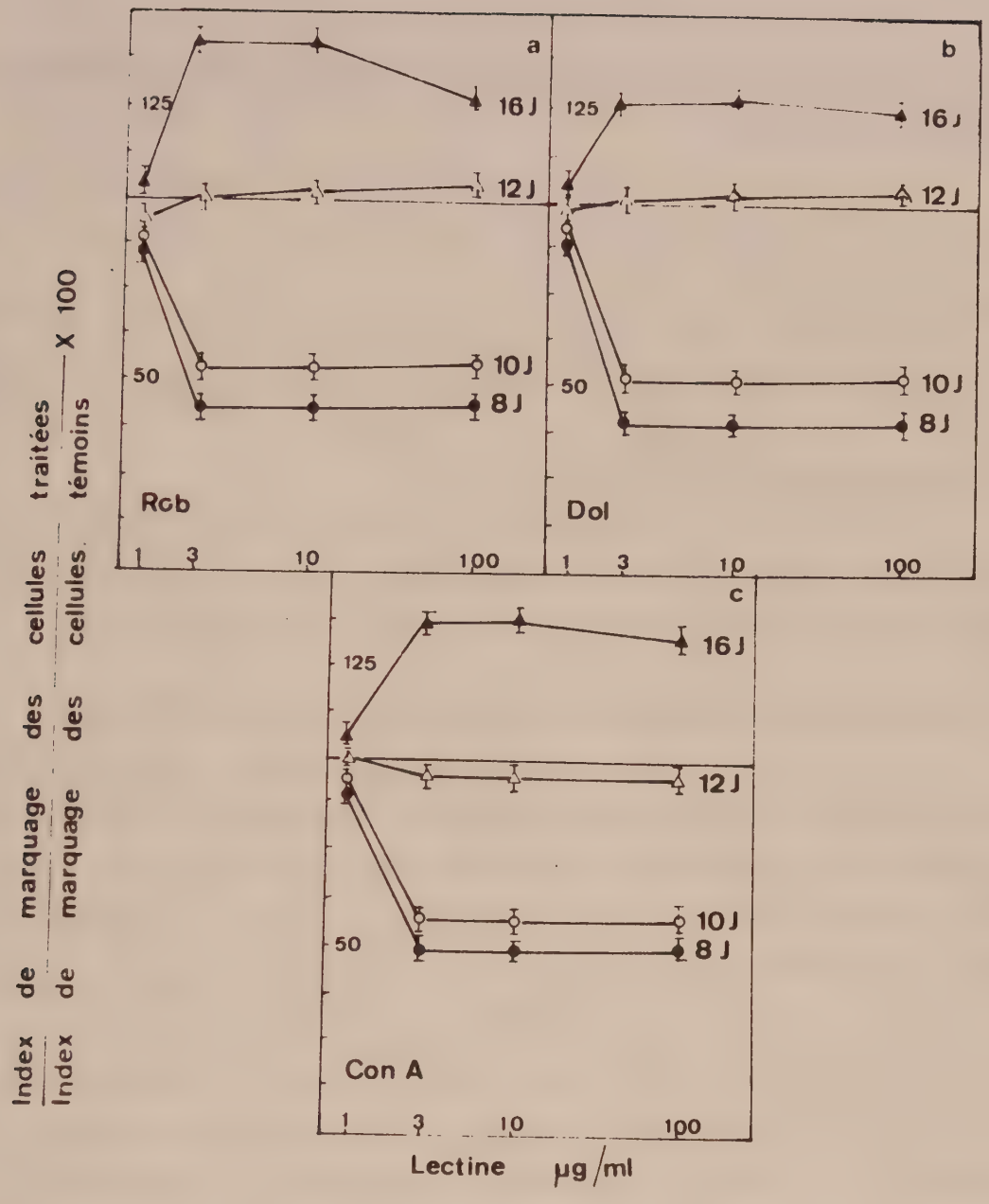


Figure 14 Action des lectines de Robinia (a), de Dolichos (b) et de la Concanavaline A (c), à différentes concentrations, sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement, après 24 heures de culture. L'index de marquage est le nombre de noyaux marqués par rapport au nombre de noyaux totaux pour 1 heure de traitement.
Le témoin est rapporté à 100.
Les concentrations de lectine qui varient de 1 à 100 µg/ml sont représentées en échelle logarithmique à base 10.

et de 29 % pour la Concanavaline A. Il est à noter qu'à la concentration de 100 µg/ml, les lectines induisent une stimulation plus faible que celle observée précédemment, puisque cette stimulation n'atteint que 16-17 % (tableau XXIV, fig 14 a, 14 b, et 14 c).

2. Action des lectines, à différents temps de culture, sur l'incorporation de thymidine tritiée

Les lectines sont ajoutées aux cultures, à la concentration finale de 3 µg/ml sauf dans le cas des cellules BHK 21/C13 et BHK 21/Py où cette concentration est de 1 µg/ml.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement (index de marquage).

a) cellules hépatiques tumorales de rat

La diminution de l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat est significative dès la 2ème heure (9 %) et se maintient jusqu'à 8 heures de culture (Tableau XXV, fig 15).

b) cellules de rein de hamster nouveau-né BHK 21/C13 et BHK 21/Py

Dans le cas des cellules BHK 21/C13, la lectine de Robinia et la Concanavaline A ajoutées à des cultures en croissance, stimulent l'incorporation de thymidine tritiée dès la 4ème heure. Cette stimulation est alors respectivement de 17 et 11 %. Par contre, la lectine de Dolichos est sans effet à des temps aussi courts (tableau XXVI, fig 16 a et 16 b). Au-delà de 4 heures, les lectines de Robinia et de Dolichos induisent une stimulation de l'incorporation de thymidine tritiée ; cette stimulation est respectivement de 257 et 192 % après 24 heures. Le maximum de stimulation est atteint après 72 heures de culture pour la lectine de Robinia et après 48 heures de culture pour la lectine de Dolichos. La Concanavaline A induit une stimulation, précédée pendant 24 heures d'une diminution de 31 % ; après 48 heures de culture, l'incorporation de thymidine tritiée est stimulée de 72 %. Le maximum de stimulation (330 %) est atteint après 72 heures de culture (tableau XXVII, fig 16 a et 16 b).

Par contre, lorsque les lectines sont ajoutées à des cultures stationnaires c'est la Concanavaline A qui induit la plus forte stimulation ; cette stimulation atteint 80 % après 24 heures de culture et augmente en fonction du temps de culture. La stimulation induite par les lectines de Robinia et de

TABLEAU XXV

Action des lectines en fonction du temps de culture, sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat. La thymidine tritiée est ajoutée pendant 1 heure. Les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement : index de marquage.

ıps en heures	Index de marquage			
	Témoin	lectine de Robinia (3 µg/ml)	Lectine de Dolichos (3 µg/ml)	Concanavaline A (3 µg/ml)
2	29,8	27,2	29,6	27,6
4	28,2	16,4	28,3	16,2
6	27,4	14,2	27,5	14,2
8	27,2	13,8	27,3	13,8

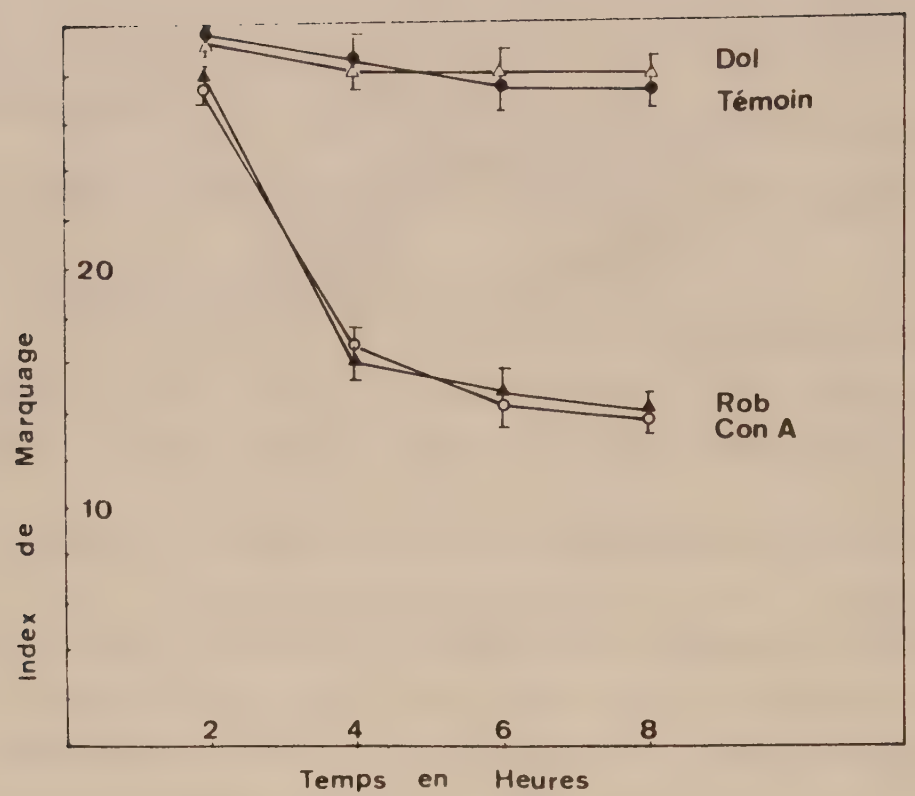


Figure 15 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A), en fonction du temps de culture, sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat. L'index de marquage est le nombre de noyaux marqués par rapport au nombre de noyaux totaux.

Tableau XXVI

Action des lectines après 4 heures d'incubation sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules de rein de hamster nouveau-né normales BHK 21/C13 et transformées par le virus du polyome BHK 21/Py. La thymidine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture.
Les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement : index de marquage.

Cellules	Index de marquage			
	Témoin	lectine de Robinia 1 µg/ml	Lectine de Dolichos 1 µg/ml	Concanavaline A 1 µg/ml
BHK 21	4,6	5,4	4,4	5,1
BHK 21/Py	18,1	16,4	16,6	15,5

Tableau XXVII

Action des lectines, en fonction du temps de culture sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules de rein de hamster nouveau-né normales BHK 21/C13. La thymidine tritiée est ajoutée pendant 4 heures pour les cultures en croissance et pendant 24 heures pour les cultures stationnaires.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement : index de marquage.

Temps en jours	Index de marquage			
	Témoin	Lectine de Robinia 1 µg/ml	Lectine de Dolichos 1 µg/ml	Concanavaline A 1 µg/ml
Cultures en croissance				
1	4,9	17,5	14,3	3,4
2	5,1	24,5	18,9	8,8
3	2,4	19,6	12,8	10,5
Cultures stationnaires				
1	1,5	1,6	1,6	2,7
2	0,8	2,0	1,3	2,6
3	0,2	0,8	0,8	1,4

Dans le cas de culture en croissance, la lectine est ajoutée après 3 heures d'incubation et l'index de marquage est déterminé après 1, 2 et 3 jours de culture avec la lectine.

Dans le cas de culture stationnaire, la lectine est ajoutée après 3 jours de culture et l'index de marquage est déterminé après 1, 2 et 3 jours de culture avec la lectine.

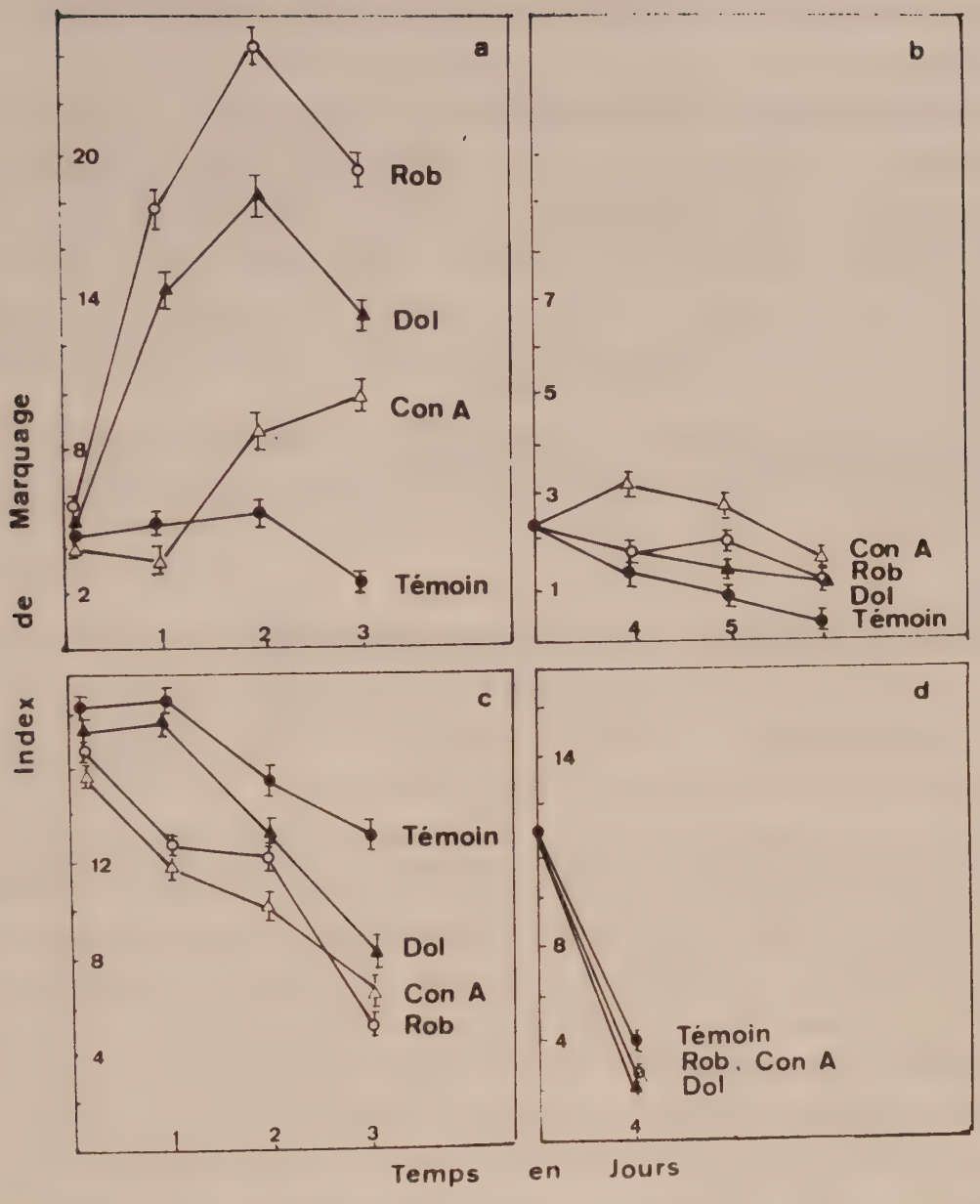


Figure 16 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A), en fonction du temps de culture, sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules de rein de hamster nouveau-né normales BHK 21/C13 en culture en croissance (a) et en culture stationnaire (b) ainsi que dans les cellules transformées par le virus du polyome BHK 21/Py en culture en croissance (c) et en culture stationnaire (d). L'index de marquage est le nombre de noyaux marqués par rapport au nombre de noyaux totaux pour une heure de traitement.

Dolichos est moins importante puisqu'elle n'atteint que 7 % après 24 heures de culture. Cette stimulation augmente au cours du temps et atteint 300 % après 72 heures de culture, mais elle reste inférieure à celle induite par la Concanavaline A (600 %) dans le même temps (tableau XXVII, fig 16 a et 16 b).

Dans le cas des cellules BHK 21/Py, la diminution de l'incorporation de thymidine tritiée induite par les lectines de Robinia, de Dolichos et la Concanavaline A, est significative dès la 4ème heure (Tableau XVI, fig 16c et 16d) dans les cultures en croissance. Cette diminution est respectivement de 31, 18 et 34 % après 24 heures de culture. La diminution est minimale après 48 heures et maximale après 72 heures de culture (tableau XXVIII, fig 16 c et 16 d).

Ajoutées à des cultures stationnaires, les lectines diminuent l'incorporation de thymidine tritiée de 25 à 28 % (tableau XXVIII, fig 16 c et 16 d).

c) Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

La Concanavaline A, les lectines de Robinia et de Dolichos, présentent des effets identiques sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet d'un âge donné.

Cette incorporation est diminuée de 66-67 % pour les cellules de 8 jours et de 38-44 % pour les cellules de 10 jours, après 24 heures de culture. Cette diminution est maintenue au cours des 72 heures de culture et atteint alors 56 % pour les cellules de 8 jours et 27-29 % pour les cellules de 10 jours (tableau XXIX, fig 17 a et 17 b). L'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de 16 jours est augmentée de 24-31 % après 24 heures de culture, et de 23-31 % après 72 heures de culture (tableau XXIX, fig 17 d). Aucune modification de l'incorporation de thymidine tritiée n'est observée dans les fibroblastes d'embryon de 12 jours, après 24, 48 ou 72 heures de culture avec les lectines. (tableau XXIX, fig 17c).

Ces résultats confirment ceux obtenus au cours de l'étude de l'action des lectines sur la croissance en nombre des cellules. Mais tandis que le maximum d'effet des lectines sur l'incorporation de thymidine tritiée est observé après 24 heures de culture, ce maximum n'est obtenu qu'après 48 heures pour la croissance en nombre de cellules. Il apparait donc que l'effet des lectines sur l'incorporation de thymidine tritiée est plus précoce que celui observé pour la croissance en nombre des cellules.

Tableau XXVIII

Action des lectines, en fonction du temps de culture, sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules de rein de hamster nouveau-né transformées par le virus du polyome BHK 21/Py. La thymidine tritiée est ajoutée pendant 4 heures pour les cultures en croissance et pendant 24 heures pour les cultures stationnaires.
Les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement : index de marquage.

Temps en jours	Index de marquage			
	Témoin	Lectine de Robinia 1 µg/ml	Lectine de Dolichos 1 µg/ml	Concanavaline A 1 µg/ml
Cultures en croissance				
1	18,1	12,6	14,8	12,0
2	15,2	12,3	12,1	10,3
3	12,8	4,9	7,8	5,1
Cultures stationnaires				
1	4,0	2,9	3,0	2,9

Dans le cas de culture en croissance, la lectine est ajoutée après 3 heures d'incubation et l'index de marquage est déterminé après 1, 2 et 3 jours de culture avec la lectine.
Dans le cas de culture stationnaire, la lectine est ajoutée après 3 jours de culture et l'index de marquage est déterminé après 4 jours de culture avec la lectine.

Tableau XXIX

Action des lectines, en fonction du temps de culture, sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement. La thymidine tritiée est ajoutée pendant 4 heures et les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement : index de marquage.

Temps en heures	Age de l'embryon en jours	Index de marquage Témoin	Lectine de Robinia 3 µg/ml	Lectine de Dolichos 3 µg/ml	Concanavaline A 3 µg/ml
24	8	23,7	8,1	7,9	7,9
	10	14,4	9,0	8,1	8,1
	12	7,8	8,0	7,9	8,1
	16	7,6	10,0	9,4	9,8
48	8	19,9	7,9	7,8	7,7
	10	10,6	7,2	7,5	7,1
	12	5,9	6,1	5,9	6,1
	16	6,0	7,5	7,4	7,5
72	8	17,1	7,6	7,6	7,5
	10	9,7	7,1	7,1	6,9
	12	4,7	5,1	4,7	5,1
	16	4,4	5,6	5,4	5,8

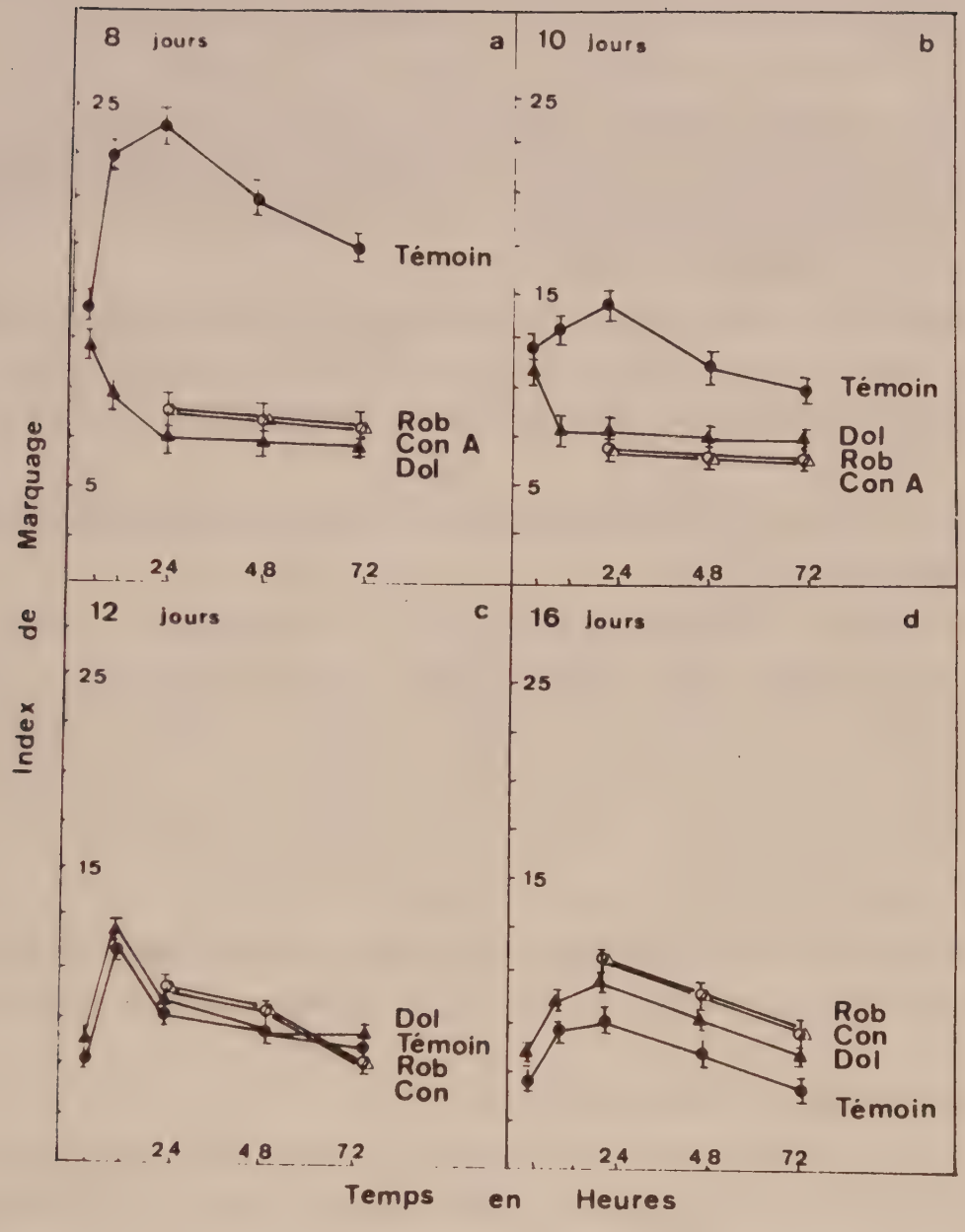


Figure 17 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A), en fonction du temps de culture, sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement.
L'index de marquage est le nombre de noyaux marqués par rapport au nombre de noyaux totaux pour une heure de traitement.

Dans le cas de la lectine de Dolichos, l'incorporation de thymidine tritiée est étudiée avant 24 heures de culture. Il apparait une différence significative entre les fibroblastes traités par la lectine et les fibroblastes témoins dès 6 heures de culture. Après 12 heures, l'action de la lectine de Dolichos est presque identique à celle observée après 24 heures de culture (tableau XXX).

D - Action des lectines sur l'incorporation de l'uridine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat et dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

L'activité de synthèse de l'ARN est rapportée à l'incorporation de l'uridine tritiée dans le matériel acido insoluble des cellules. La radioactivité est déterminée par comptage en scintillation liquide.

1. Action des lectines, à différentes concentrations, sur l'incorporation d'uridine tritiée.

Les lectines de Robinia, de Dolichos et la Concanavaline A, sont ajoutées aux cultures à des concentrations finales variant de 1 à 100 µg/ml.

L'incorporation d'uridine tritiée est exprimée en désintégrations par minute pour un million de cellules (dpm/10^6 cellules) ; elle est mesurée après 6 heures de culture pour les cellules hépatiques tumorales de rat, et après 24 heures de culture pour les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de stimulation ou de diminution de l'incorporation de l'uridine tritiée par rapport au témoin rapporté à 100.

a) Cellules hépatiques tumorales de rat

La lectine de Robinia et la Concanavaline A ont des effets identiques. A la concentration de 1 µg/ml, ces lectines ne modifient pas l'incorporation d'uridine tritiée dans les cellules. A des concentrations de lectines variant de 3 à 50 µg/ml, l'incorporation d'uridine tritiée est augmentée de 118 % pour la Concanavaline A et de 121 % pour la lectine de Robinia. Par contre, à la concentration de 100 µg/ml, la stimulation est très faible ; cette stimulation est de 16 % pour la Concanavaline A et de 8 % pour la lectine de Robinia (Tableau XXXI, fig. 18).

La lectine de Dolichos ne modifie pas l'incorporation d'uridine tritiée dans les cellules, même à la concentration de 100 µg/ml (tableau XXXI, fig 18).

Tableau XXX

Action de la lectine de Dolichos, après 6 et 12 heures de culture, sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement. La thymidine est ajoutée pendant 6 et 12 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement : index de marquage.

Temps en heures	Age de l'embryon en jours	Index de marquage Témoin	Index de marquage Lectine de Dolichos 3 µg/ml
6	6	15,3	13,0
	8	14,7	12,2
	10	12,0	11,0
	12	5,4	6,0
	16	4,7	5,2
12	6	23,4	11,0
	8	22,3	10,1
	10	13,2	8,0
	12	11,2	11,3
	16	7,3	8,5

Tableau XXXI

Action des lectines, à différentes concentrations sur l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble des cellules hépatiques tumorales de rat après 6 heures de culture. L'uridine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

	dpm x 10^3 / 10^6 cellules		
µg/ml	Lectine de Dolichos	Concanavaline A	Lectine de Robinia
0	38,3	38,3	38,3
1	-	38,1	38,2
3	38,0	83,9	84,2
6	-	83,5	84,1
10	-	83,6	84,2
25	-	83,4	84,8
50	-	83,1	84,8
100	38,1	44,6	41,6

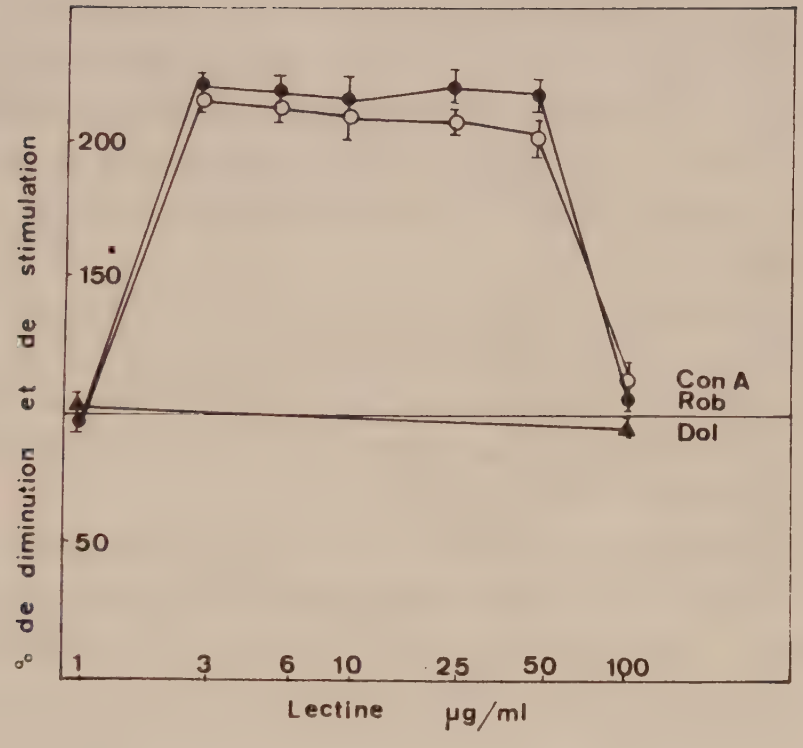


Figure 18 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A), à différentes concentrations, sur l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble des cellules hépatiques tumorales de rat après 6 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de stimulation ou de diminution de l'incorporation par rapport au témoin rapporté à 100.
Les concentrations de lectine qui varient de 1 à 100 µg/ml sont représentées en échelle logarithmique à base 10.

b) Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

A la concentration de 1 µg/ml, les lectines de Robinia, de Dolichos et la Concanavaline A ne modifient pas l'incorporation d'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement.

Dans les fibroblastes de jeunes embryons et à des concentrations variant de 3 à 50 µg/ml, cette stimulation est de 30-32 % pour la lectine de Robinia, de 22 % pour la lectine de Dolichos, et de 39-41 % pour la Concanavaline A. Dans les cellules de 10 jours, la stimulation varie de 20 à 40 %, le maximum de stimulation est observé à la concentration de 6 µg/ml pour les trois lectines. A la concentration de 100 µg/ml, la lectine de Dolichos n'induit pas de diminution de l'incorporation d'uridine tritiée dans les cellules de 8 jours, tandis que la lectine de Robinia et la Concanavaline A la diminuent respectivement de 22 % et de 48 %. A cette concentration, la lectine de Robinia et la Concanavaline A ne modifient pas l'incorporation d'uridine tritiée dans les cellules de 10 jours (tableau XXXII, fig 19 a et 19 b).

Dans les fibroblastes d'embryon de 12 jours et à des concentrations variant de 3 à 50 µg/ml, les lectines ne modifient pas l'incorporation d'uridine tritiée. A la concentration de 100 µg/ml, la lectine de Robinia et la Concanavaline A induisent une diminution de 11 % de l'incorporation d'uridine tritiée (tableau XXXII, fig 19 c).

Dans les fibroblastes d'embryon de 16 jours et à des concentrations variant de 3 à 50 µg/ml, les lectines ne modifient pas l'incorporation d'uridine tritiée. A la concentration de 100 µg/ml, la lectine de Robinia et la Concanavaline A diminuent l'incorporation d'uridine tritiée ; cette diminution est respectivement de 42 et 38 % (tableau XXXII, fig 19 d).

2. Action des lectines à différents temps de culture sur l'incorporation d'uridine tritiée

Les lectines de Robinia, de Dolichos et la Concanavaline A sont ajoutées aux cultures, à la concentration finale de 6 µg/ml. L'incorporation d'uridine tritiée est déterminée après différents temps de culture, et exprimée en désintégrations par minute pour un million de cellules (dpm/10^6 cellules).

a) cellules hépatiques tumorales de rat

La lectine de Robinia et la Concanavaline A diminuent l'incorporation d'uridine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales pour des temps compris entre 5 et 30 minutes. Cette diminution est de 25 % après 5 minutes.

Tableau XXXII

Action des lectines à différentes concentrations, sur l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement, après 24 heures de culture.
L'uridine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

µg/ml	dpm x 10^3 / 10^6 cellules Age de l'embryon en jours			
	8	10	12	16
Témoin	46	10	9	24
Lectine de Robinia				
1	46	10	9	24
3	61	13	9	24
6	61	14	9	24
10	61	13	9	24
25	61	13	9	23
50	60	12	8	21
100	36	10	8	14
Lectine de Dolichos				
1	47	11	9	24
3	56	14	9	24
6	56	14	9	24
10	56	13	9	24
25	56	13	9	24
50	56	12	9	23
100	55	11	9	23
Concanavaline A				
1	47	11	9	23
3	65	14	9	24
6	65	14	9	24
10	65	13	9	24
25	64	13	9	23
50	64	13	9	22
100	24	10	8	15

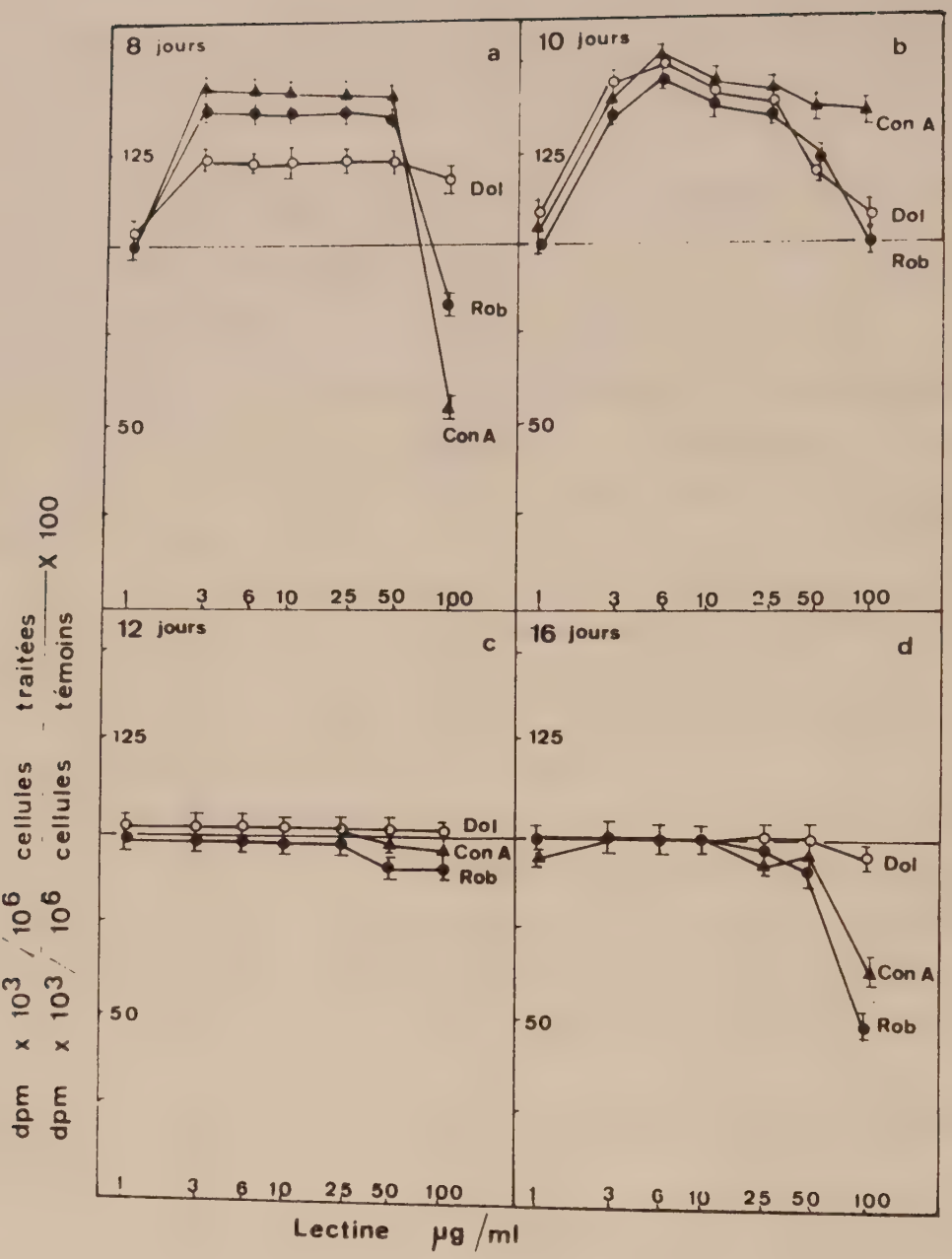


Figure 19 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol), et de la Concanavaline A (Con A) à différentes concentrations sur l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement et après 24 heures de culture.
Les résultats sont exprimés en pourcentage de stimulation ou de diminution de l'incorporation par rapport au témoin rapporté à 100.
Les concentrations de lectine qui varient de 1 à 100 µg/ml sont représentées en échelle logarithmique à base 10.

L'effet des lectines n'est pas stable ; en effet, la diminution est minimale après 10 minutes (6 %), puis augmente pour atteindre 16 % après 15 minutes et 32-33 % après 30 minutes. Au-delà de 30 minutes, les lectines stimulent l'incorporation d'uridine tritiée. Cette stimulation est de 27-28 % après 1 heure de culture, puis elle augmente jusqu'à la 8e heure de culture, atteignant 213 % (tableau XXXIII, fig 20).

Par contre, la lectine de Dolichos ne modifie pas l'incorporation d'uridine tritiée pour des temps variant de 5 minutes à 8 heures (tableau XXXIII fig 20).

b) Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

La Concanavaline A et les lectines de Robinia et de Dolichos ont des effets identiques sur l'incorporation d'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet d'un âge donné.

Dans les cellules de 8- et de 10-jours et après 15 minutes, les lectines diminuent l'incorporation d'uridine tritiée ; cette diminution est de 34 % pour les cellules de 8 jours et de 25 % pour les cellules de 10 jours. A des temps variant de 30 minutes à 4 heures, la diminution induite par les lectines varie peu et atteint après 4 heures 41 % pour les cellules de 8 jours et 30-36 % pour les cellules de 10 jours.

Dans les cellules de 12 jours, les lectines n'ont aucun effet pour des temps de 15 et 30 minutes. Puis à partir de 1 heure, les lectines diminuent de 25 % l'incorporation d'uridine tritiée. Cette diminution se maintient au cours du temps et atteint 20 % après 4 heures.

Dans les cellules de 16 jours, les lectines sont sans effet jusqu'à la 2ème heure de traitement ; après 3 heures la stimulation est de 20 %. A la 4ème heure, cette stimulation n'est plus que de 14 % (tableau XXXIV, fig 21).

A des temps de culture de 24, 48 et 72 heures, l'effet des lectines est différent de celui rapporté précédemment pour des temps courts (15 minutes à 4 heures).

Dans les fibroblastes de jeunes embryons, les lectines stimulent l'incorporation d'uridine tritiée. Dans les cellules de 8 jours et après 24 heures de culture, cette stimulation est respectivement de 32, 22 et 41 % pour les lectines de Robinia, de Dolichos et pour la Concanavaline A. Le maximum de stimulation (91 %) induite par la lectine de Robinia est atteint après 48 heures, les maxima induits par la lectine de Dolichos et la Concanavaline A (respectivement 115 et 93 %) sont atteints après 72 heures.

Tableau XXXIII

Action des lectines en fonction du temps de culture, sur l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble des cellules hépatiques tumorales de rat. L'uridine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

Temps	dpm x $10^3/10^6$ cellules			
	Témoin	Lectine de Dolichos (6 µg/ml)	Concanavaline A (6 µg/ml)	Lectine de Robinia (6 µg/ml)
5 minutes	0,8	0,8	0,6	0,6
10 "	1,7	1,7	1,6	1,6
15 "	3,7	3,7	3,1	3,1
30 "	9,1	8,9	6,1	6,2
1 heure	13,7	14,0	17,5	17,4
2 "	25,3	24,8	31,6	31,5
4 "	41,8	41,7	53,8	54,1
6 "	38,3	38,0	83,5	84,1
8 "	38,6	38,2	120,9	121,1

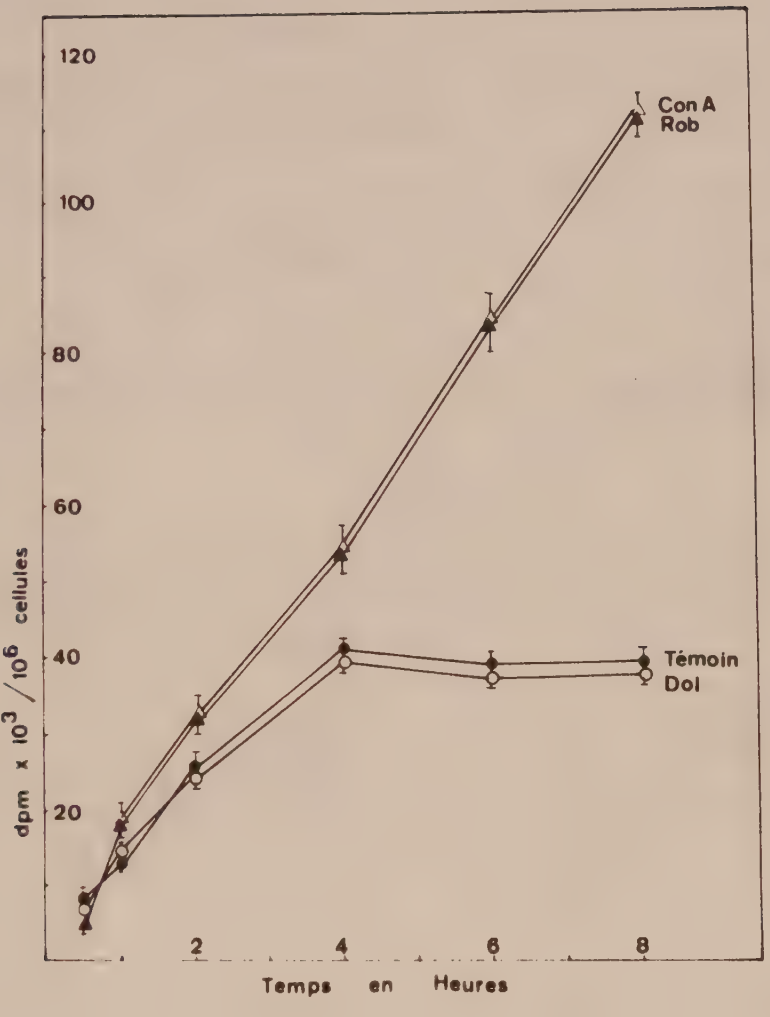


Figure 20 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A), en fonction du temps de culture, sur l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble des cellules hépatiques tumorales de rat.
Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

Tableau XXXIV

Action des lectines, à des temps compris entre 15 minutes et 4 heures, sur l'incorporation d'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement. L'uridine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

		dpm x 10^3 / 10^6 cellules			
mps en heures	Age de l'embryon en jours	Témoin	Lectine de Dolichos 6 µg/ml	Concanavaline A 6 µg/ml	Lectine de Robinia 6 µg/ml
1/4	8	6	4	4	4
	10	4	3	3	3
	12	2	2	2	2
	16	1	1	1	1
1/2	8	8	5	5	5
	10	7	5	5	5
	12	3	3	3	3
	16	2	2	2	2
1	8	11	7	7	7
	10	7	5	5	5
	12	4	3	3	3
	16	3	3	3	3
2	8	21	13	13	13
	10	11	8	8	8
	12	6	5	5	5
	16	5	5	5	5
3	8	32	21	21	21
	10	18	11	11	12
	12	9	7	7	7
	16	5	6	6	6
4	8	44	26	25	26
	10	25	16	15	15
	12	10	8	8	8
	16	7	8	8	8

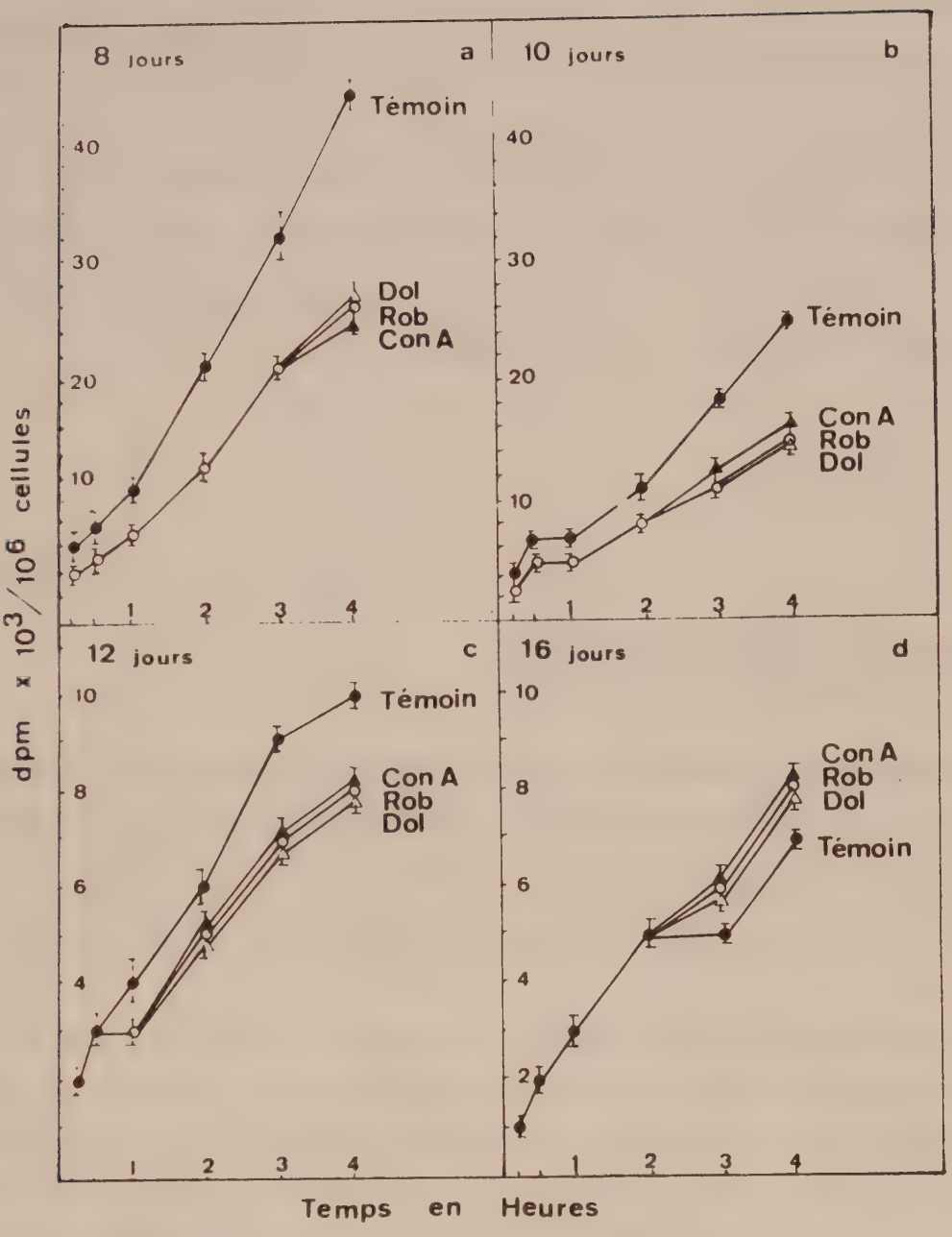


Figure 21 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A) à différents temps de culture variant de 15 minutes à 4 heures, sur l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement.
Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

Dans les cellules de 10 jours et après 24 heures de culture, la Goncanavaline A et les lectines de Robinia et de Dolichos stimulent (40 %) l'incorporation d'uridine tritiée. Le maximum de stimulation est atteint après 24 heures pour la lectine de Robinia (40 %) après 72 heures pour la lectine de Dolichos (56 %), et après 48 heures pour la Concanavaline A (22 %).

Dans les fibroblastes d'embryons de 12 et de 16 jours, les lectines ne modifient pas l'incorporation d'uridine tritiée à des temps variant de 24 à 48 heures (Tableau XXXV, fig. 22).

Il apparait donc que pour un type de cellules donné, l'effet des lectines sur l'incorporation d'uridine tritiée varie selon le temps d'incubation.

II - SPECIFICITE D'ACTION DES LECTINES

Les lectines n'agissent sur les cellules qu'après fixation à des sites récepteurs de nature glucidique localisés à la surface cellulaire. Cette nécessité a été confirmée pour la cytoagglutination (GOLDSTEIN et al. 1965, ENTLICHER et al. 1969, NICOLSON 1974) et pour la lymphostimulation (BORBERG et al. 1968, POWELL et LEON 1970, NOVOGRODSKY et al. 1972) induites par les lectines.

Les déterminants glucidiques de certaines lectines ont été définis. Ces déterminants sont la N-acétyl-glucosamine pour la lectine du germe de blé (BURGER et al. 1967), la N-acétyl-galactosamine pour la lectine de Soja (LIS et al. 1970), le galactose pour la lectine de Ricin (NICOLSON et al. 1974) et le mannose pour la Concanavaline A. Cependant, pour certaines lectines, aucun déterminant monosaccharidique n'a pu être trouvé ; il en est ainsi pour la lectine d'Agaricus campestris (SAGE et al. 1967) et pour la lectine de Robinia pseudoacacia (BOURRILLON et FONT 1968, FONT et BOURRILLON 1971).

Des composés glucidiques inhibent la fixation des lectines à la surface

Tableau XXXV

Action des lectines à des temps de culture variant de 24 à 72 heures, sur l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement. L'uridine est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

		dpm x 10^3 / 10^6 cellules		
mps en eures	Age de l'embryon en jours	Témoin	Lectine de Robinia (6 µg/ml)	Lectine de Dolichos (6 µg/ml)	Concanavaline A (6 µg/ml)
24	8	46	61	56	65
	10	10	14	14	14
	12	9	9	9	9
	16	24	24	24	24
48	8	47	90	95	81
	10	31	38	47	38
	12	14	14	15	13
	16	27	26	28	26
72	8	46	78	99	89
	10	29	35	45	35
	12	18	19	19	17
	16	41	44	45	42

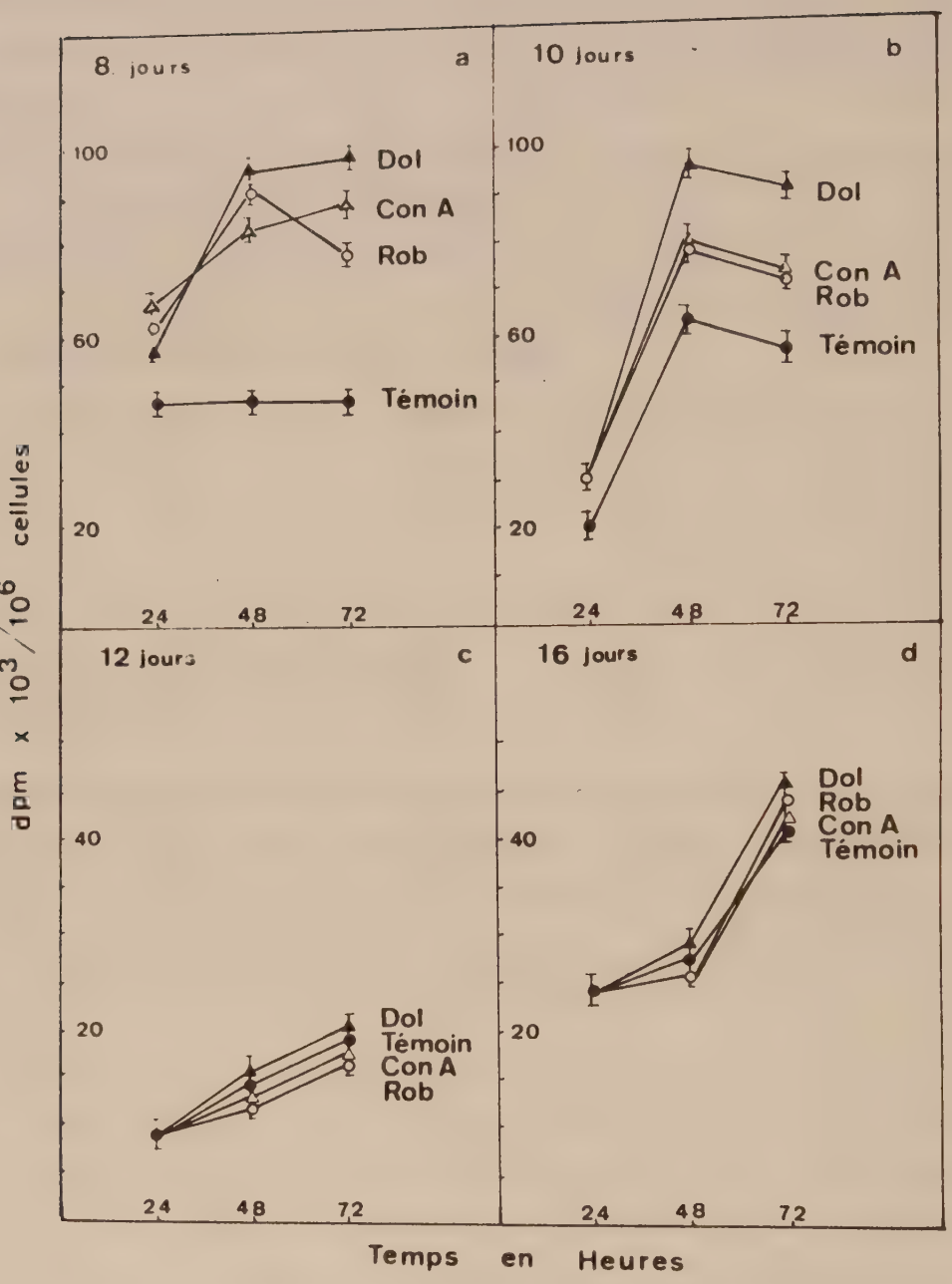


Figure 22 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A) après 24, 48 et 72 heures de culture, sur l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement.
Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

des fibroblastes d'embryon de poulet (ROGUET et BOURRILLON 1975) et des cellules hépatiques normales et tumorales de rat (DODEUR, MOREAU : communications personnelles). L'action des lectines sur la croissance cellulaire est-elle aussi inhibée par ces composés ? Le test d'inhibition hapténique permet de répondre à cette question.

Les composés testés ne modifient pas, par eux-mêmes, la croissance cellulaire. Les lectines (6 µg/ml) sont incubées avec des doses croissantes d'inhibiteur. Le mélange est ajouté aux cultures. Le nombre de cellules est déterminé après 24 heures pour les fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours, après 72 heures pour les cellules hépatiques normales de rat, et après 8 heures pour les cellules hépatiques tumorales de rat. Un essai d'inhibition de l'action de la lectine de Dolichos, sur l'incorporation de thymidine tritiée a été réalisé pour les fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours, après 24 heures de culture.

Le rapport molaire de l'inhibiteur et de la lectine est noté "p", et déterminé selon la formule suivante : $p = \frac{[\text{Inhibiteur}]}{[\text{Lectine}]}$,

et la concentration molaire de la lectine $[\text{Lectine}]$ est ramenée à 1.

A - Inhibition des effets des lectines par des monosaccharides

L'α méthyl mannose est un puissant inhibiteur des effets de la Concanavaline A. Une inhibition de 100 % de l'activité de la Concanavaline A sur la croissance cellulaire est obtenue pour un rapport "p" de 5-10 et de 3,7-5, respectivement dans le cas des fibroblastes d'embryon de 10 et 16 jours et dans les cellules hépatiques normales et tumorales de rat (Tableau XXXVI, fig 23). Par contre, l'α methyl mannose n'est pas inhibiteur des effets des lectines de Robinia et de Dolichos, même pour un rapport "p" de 1000 (tableaux XXXVI, XXXVII).

La N-acétyl-galactosamine est un puissant inhibiteur des effets de la lectine de Dolichos. Ainsi, le mélange monosaccharide-lectine dans un rapport "p" de 6,25 inhibe respectivement de 75 et 83 %, l'activité de la lectine sur la croissance des fibroblastes d'embryon de 10 et de 16 jours (tableau XXXVII, fig 24). La N-acétylgalactosamine n'est pas inhibiteur des effets de la lectine de Robinia et de la Concanavaline A, même pour un rapport "p" de 625 (tableau XXXVI).

L'α méthyl mannose inhibe seulement l'action de la Concanavaline A. La N-acétyl galactosamine inhibe seulement l'action de la lectine de Dolichos.

Tableau XXXVI

Inhibition spécifique, par les monosaccharides, des effets de la Concanavaline (Con A) et de la lectine de Robinia (Rob) sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours (après 24 heures de culture) et des cellules hépatiques normales et tumorales de rat (respectivement après 72 et 8 heures de culture).

	Nombre de cellules x 10^6/ml			
	Fibroblastes 10 jours	Fibroblastes 16 jours	Cellules hépatiques tumorales	Cellules hépatiques normales
Témoin	4,5	1,9	0,70	5,0
Concanavaline A (6 µg/ml)	2,9	2,5	0,25	7,2
Lectine de Robinia (6 µg/ml)	2,9	2,5	0,25	9,0
α méthyl-mannose (1000 M/M)	4,5	1,9	0,70	5,1
Con A + α methyl mannose				
1 M/M	3,0	2,6	0,25	7,0
1,9	3,0	2,6	0,55	6,6
3,7	4,2	2,6	0,70	5,5
5,0	4,6	2,0	0,70	5,4
10	4,5	1,9	0,70	5,2
37	4,5	1,9	0,70	5,1
1000	4,5	1,9	0,70	5,1
Rob + α methyl-mannose 1000 M/M	2,8	2,5	0,25	9,0
N-acétyl-D-galactosamine (625 M/M)	4,5	2,5	0,25	9,0
Con A + N-acétyl-D-galactosamine (625 M/M)	2,8	2,5	0,25	7,1
Rob + N-acétyl-D-galactosamine (625 M/M)	2,8	2,5	0,25	9,0

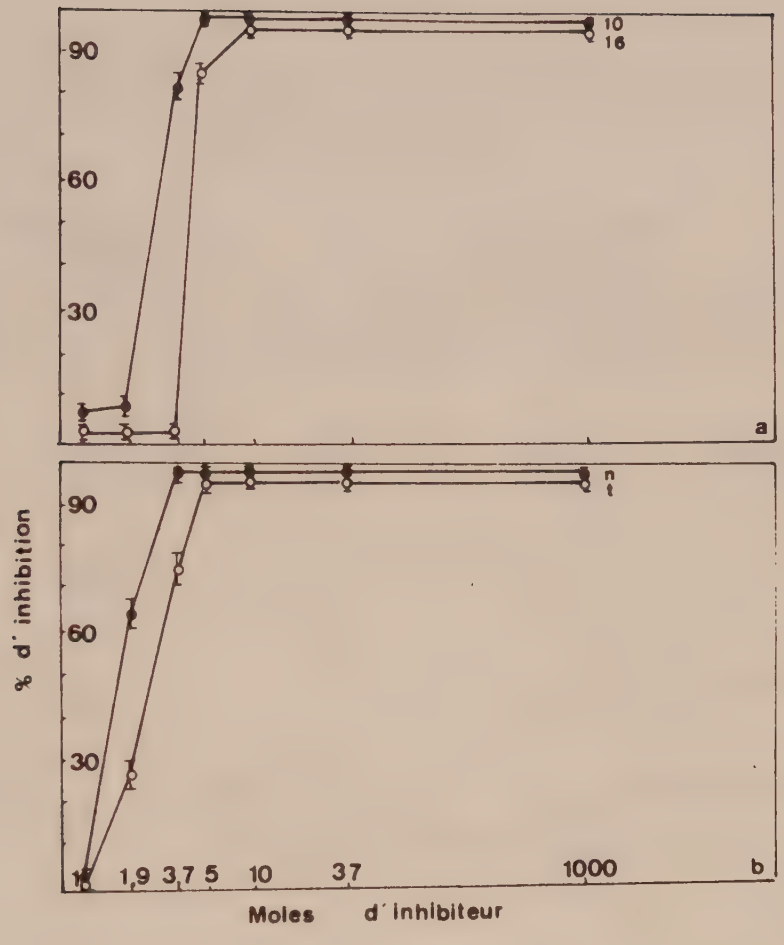


Figure 23 Inhibition spécifique, par l'αméthyl-mannose, de l'activité de la Concanavaline A, sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours (a) après 24 heures de culture, et des cellules hépatiques normales (n) et tumorales (t) de rat (b) respectivement après 72 et 8 heures de culture.
Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité de la lectine.
Le nombre de moles d'inhibiteur pour 1 mole de lectine qui varie de 1 à 1000 est représenté en échelle logarithmique à base 10.

Tableau XXXVII

Inhibition spécifique par les monosaccharides des effets de la lectine de Dolichos (Dol) sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours après 24 heures de culture.
Les résultats sont exprimés en pourcentage de noyaux qui ont incorporé la thymidine tritiée pendant une heure de traitement (index de marquage).

	Index de marquage	
	Fibroblastes 10 jours	Fibroblastes 16 jours
Témoin	14,4	7,6
Lectine de Dolichos (6 µg/ml)	8,1	9,4
α méthyl-mannose (1000 M/M)	14,3	7,6
Dol + α méthyl-mannose (1000 M/M)	8,0	9,4
N-acétyl-D-galactosamine (625 M/M)	14,3	7,5
Dol + N-acétyl-D-galactosamine		
625 M/M	14,3	7,5
62,5	14,1	7,5
6,25	12,9	7,9
0,625	7,9	9,3

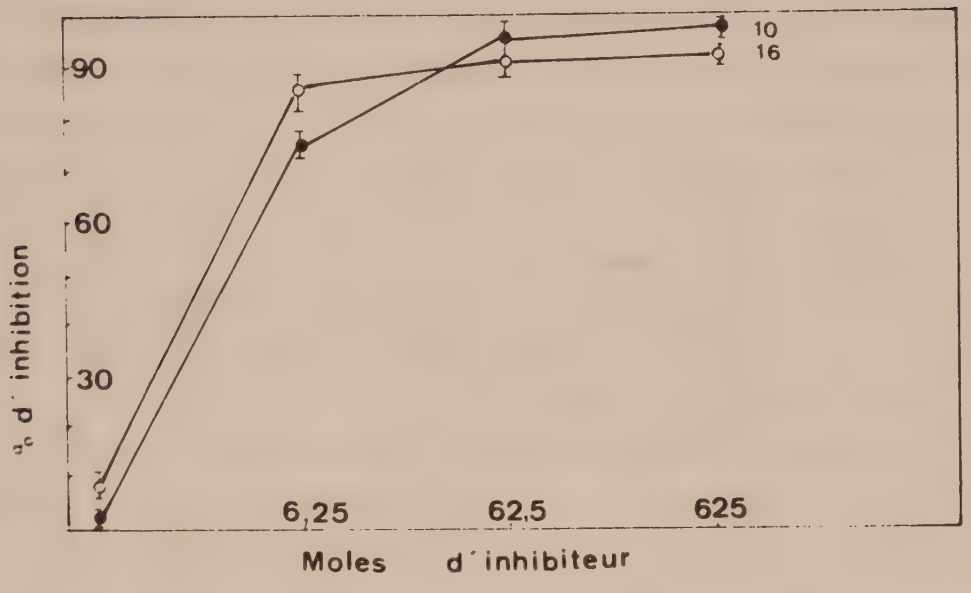


Figure 24 Inhibition spécifique, par la N-acetyl-galactosamine, de l'activité de la lectine de Dolichos, sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et 16 jours après 24 heures de culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité de la lectine.
Le nombre de moles d'inhibiteur pour 1 mole de lectine, qui varie de 0,625 à 625 est représenté en échelle logarithmique à base 10.

Aucun de ces deux monosaccharides inhibe l'action de la lectine de Robinia .

Existe t-il un inhibiteur de nature glucidique de l'action de la lectine de Robinia ? Dans ce but, des structures glucidiques plus complexes sont utilisées.

B - Inhibition des effets des lectines par des saccharides urinaires

Un fuco-oligosaccharide et un hexasaccharide sont testés comme inhibiteur des effets de la lectine de Robinia et de la Concanavaline A sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours, et des cellules hépatiques normales et tumorales de rat.

L'hexasaccharide inhibe l'action de la Concanavaline A sur la croissance des fibroblastes d'embryon de 10 jours et des cellules hépatiques tumorales cette inhibition atteint 87-90 % pour un rapport "p" de 6 (tableau XXXVIII, fig 25). Cet hexasaccharide n'est pas inhibiteur des effets de la Concanavaline A sur la croissance des fibroblastes d'embryon de 16 jours et des cellules hépatiques normales, même pour un rapport "p" de 367 (tableau XXXVIII).

A l'inverse, cet hexasaccharide inhibe l'effet de la lectine de Robinia sur les fibroblastes de 16 jours et les cellules hépatiques normales, l'inhibition atteint 84 % , respectivement pour des rapports "p" de 3,5 et 6 (tableau XXXVIII, fig. 26).

Le fuco oligosaccharide a une activité inhibitrice exactement inverse de celle de l'hexasaccharide. Ce fuco-oligosaccharide inhibe l'effet de la Concanavaline A sur la croissance des fibroblastes de 16 jours et des cellules hépatiques normales. Dans le premier cas, cette inhibition est de 85 % pour un rapport "p" de 3,5 ; dans le second cas, cette inhibition est de 82 % pour un rapport "p" de 6. L'action de la Concanavaline A sur la croissance des fibroblastes de 10 jours et des cellules hépatiques tumorales n'est pas inhibée, même pour un rapport "p" de 240.

Pour la lectine de Robinia, ce sont les réponses inverses qui sont observées. L'inhibition de l'action de la lectine de Robinia est de 87 % pour les fibroblastes de 10 jours et de 100 % pour les cellules hépatiques tumorales, respectivement pour un rapport "p" de 4-6 et de 2-6 (tableau XXXVIII, fig 27). Par contre, l'action de la lectine de Robinia sur la croissance des fibroblastes d'embryon de 16 jours et des cellules hépatiques normales, n'est pas inhibée, même pour un rapport "p" de 240 (tableau XXXVIII).

L'ensemble de ces résultats est rapporté dans le tableau XXXIX.

Tableau XXXVIII

Inhibition spécifique, par des saccharides urinaires, des effets de la Concanavaline A (Con A) et de la lectine de Robinia (Rob) sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours (après 24 heures de culture) et des cellules hépatiques normales et tumorales de rat (respectivement après 72 et 8 heures de culture).

	Nombre de cellules x 10^6/ml			
	Fibroblastes 10 jours	Fibroblastes 16 jours	Cellules hépatiques tumorales	Cellules hépatiques normales
Témoin	4,5	1,9	0,70	5,0
Concanavaline A (6 µg/ml)	2,9	2,5	0,25	7,2
Lectine de Robinia (6 µg/ml)	2,9	2,5	0,25	9,0
Hexasaccharide (367 M/M)	4,6	1,8	0,70	5,1
Con A + Hexasaccharide				
1,2 M/M	2,8	2,6	0,25	7,2
3,5	3,0	2,6	0,50	7,2
6,0	4,3	2,5	0,66	7,1
30	4,5	2,5	0,70	7,1
367	4,5	2,4	0,70	7,1
Rob + Hexasaccharide				
1,2 M/M	2,8	2,5	0,26	8,6
3,5	2,8	1,8	0,25	8,4
6,0	2,8	1,8	0,25	5,8
30	2,8	1,9	0,26	5,1
367	2,8	1,9	0,25	5,1
Fuco-oligosaccharide (240 M/M)	4,5	1,8	0,70	5,0
Con A + Fuco oligosaccharide				
1,2 M/M	2,9	2,5	0,25	6,8
2,4	2,9	2,1	0,25	5,8
3,5	2,9	1,8	0,25	5,6
6,0	2,9	1,8	0,25	5,4
24	2,9	1,9	0,24	5,1
240	2,8	1,9	0,24	5,1
Rob + Fuco oligosaccharide				
1,2 M/M	2,9	2,6	0,26	9,2
2,4	2,9	2,5	0,50	9,1
3,5	4,3	2,5	0,70	9,1
6,0	4,4	2,6	0,70	9,0
24	4,4	2,5	0,70	9,1
240	4,4	2,5	0,70	9,0

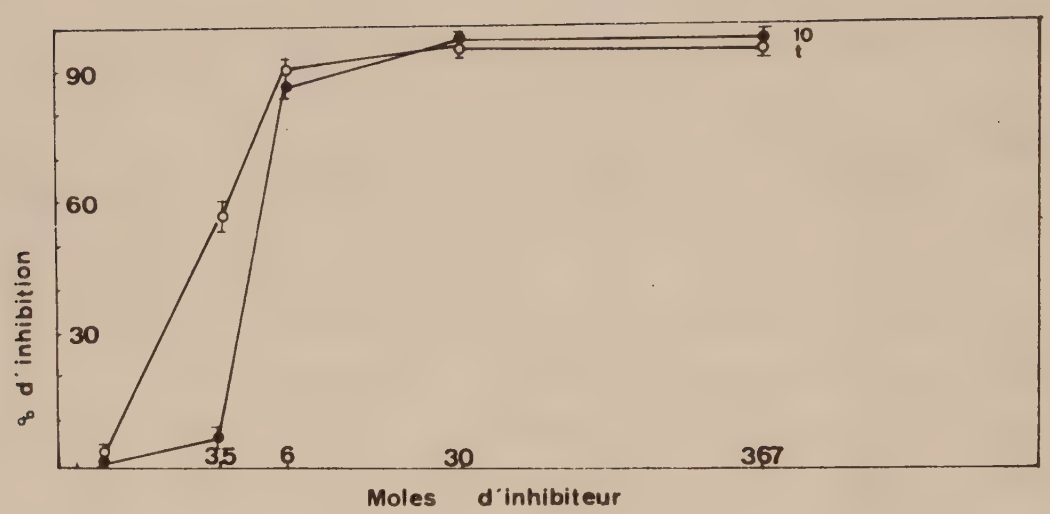


Figure 25 Inhibition spécifique, par un hexasaccharide urinaire, de l'activité de la Concanavaline A, sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 jours après 24 heures de culture, et des cellules hépatiques tumorales (t) de rat après 8 heures de culture.
Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité de la lectine.
Le nombre de moles d'inhibiteur pour 1 mole de lectine qui varie de 1,2 à 367 est représenté en échelle logarithmique à base 10.

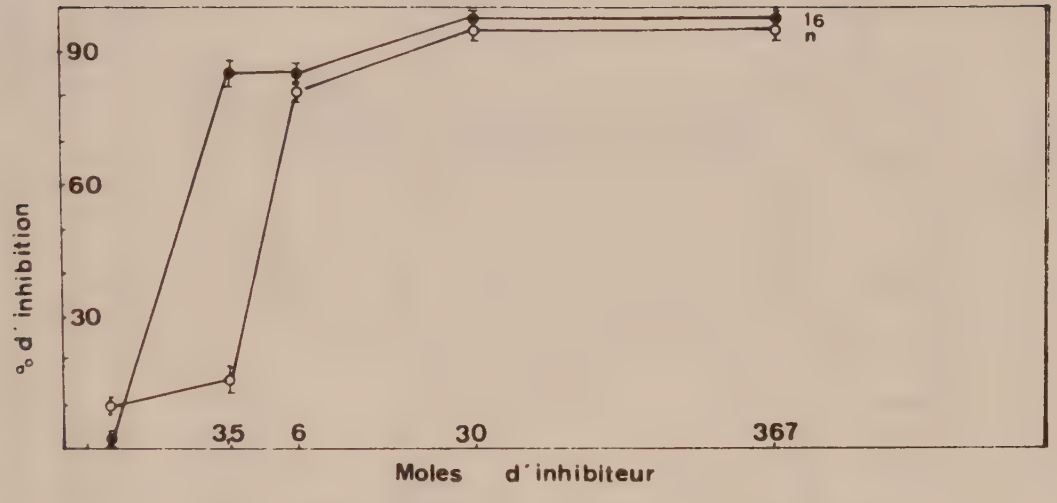


Figure 26 Inhibition spécifique, par un hexasaccharide urinaire, de l'activité de la lectine de Robinia sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 16 jours après 24 heures de culture, et des cellules hépatiques normales (n) de rat après 72 heures de culture.
Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité de la lectine.
Le nombre de moles d'inhibiteur pour 1 mole de lectine qui varie de 1,2 à 367 est représenté en échelle logarithmique à base 10.

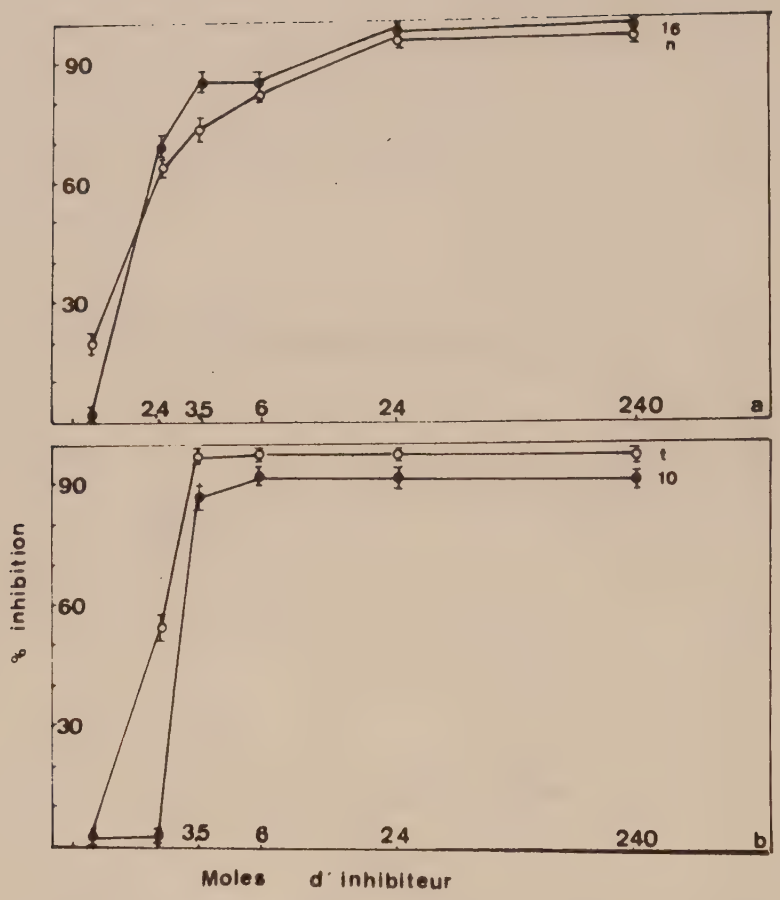


Figure 27 Inhibitions spécifiques des activités de la lectine de Robinia et de la Concanavaline A par un fuco-oligosaccharide urinaire.
a) Inhibition spécifique, par ce fuco-oligosaccharide, de l'activité de la Concanavaline A sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 16 jours après 24 heures de culture, et des cellules hépatiques normales (n) de rat après 72 heures de culture.
b) Inhibition spécifique, par ce fuco-oligosaccharide, de l'activité de la lectine de Robinia sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 jours après 24 heures de culture, et des cellules hépatiques tumorales (t) de rat après 8 heures de culture.
Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité des lectines. Le nombre de moles d'inhibiteur pour 1 mole de lectine qui varie de 1,2 à 240 est représenté en échelle logarithmique à base 10.

Tableau XXXIX

Comparaison de l'inhibition des effets de la Concanavaline A et de la lectine de Robinia sur la croissance des cellules hépatiques normales et tumorales de rat, et des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et 16 jours. L'efficacité d'inhibition est exprimée en nombre de moles d'inhibiteur pour 1 mole de lectine (Rapport "q").

Inhibiteur	Rapport "ρ"							
	Concanavaline A				Lectine de Robinia			
	Cellules hépatiques normales	Cellules hépatiques tumorales	Fibroblastes 16 jours	Fibroblastes 10 jours	Cellules hépatiques normales	Cellules hépatiques tumorales	Fibroblastes 16 jours	Fibroblastes 10 jours
α methyl-mannopyranoside	2-9	2-9	4-5	4-5	>1000	>1000	>1000	>1000
Fuco-oligosaccharide	2-6	>265	6	>367	>313	2-6	>240	4-6
Hexasaccharide	>289	4-7	>240	4-6	5-9	>367	4-6	>367

C - Inhibition des effets des lectines par des sérums anti lectine

Les résultats sont exprimés ici dans le rapport suivant : dilution du sérum anti-lectine inhibant 19,5 µg de lectine homologue (6 µg/ml).

La lectine de Dolichos, préalablement incubée avec le sérum anti-lectine de Dolichos à la dilution de 1:25 a son activité inhibée à 71 et 100 % respectivement dans le cas des fibroblastes d'embryon de 10 et de 16 jours. Cette inhibition dépend de la dilution du sérum ; en effet, la lectine de Dolichos préalablement incubée avec le sérum anti-lectine de Dolichos à la dilution de 1:100, conserve son activité à 100 % (tableau XL, fig 28). La lectine de Dolichos préalablement incubée avec le sérum anti-lectine de Robinia, ou anti Concanavaline A, à la dilution de 1:2, est active à 100 % (tableau XL).

La Concanavaline A, préalablement incubée avec le sérum anti Concanavaline A à la dilution de 1:25 a son activité inhibée de 75, 100, 90 et 64 % respectivement sur la croissanee des fibroblastes d'embryon de 10 et de 16 jours, les cellules hépatiques normales et tumorales de rat (tableau XL, fig 29). Par contre, la Concanavaline A, préalablement incubée avec le sérum anti-lectine de Robinia ou anti lectine de Dolichos à la dilution de 1:2 est active à 100 % sur la croissance des différents types de cellules (tableau XL).

La lectine de Robinia, préalablement incubée avec le sérum anti-lectine de Robinia à la dilution de 1:25 a son activité inhibée de 75, 100, 91 et 65 % respectivement sur la croissance des fibroblastes d'embryon de 10 et de 16 jours, des cellules hépatiques normales et tumorales de rat (tableau XL, fig 30). L'activité de la lectine de Robinia sur la croissance des différents types de cellules n'est pas inhibée par le sérum anti lectine de Dolichos ou par le sérum anti Concanavaline A (tableau XL).

Ainsi, un immun-sérum donné inhibe l'activité de la lectine homologue et n'inhibe pas l'activité de lectines hétérologues. L'ensemble des résultats est rapporté dans le tableau XLI, où est exprimée la dilution d'immun-sérum nécessaire pour inhiber à 80 % l'activité de la lectine homologue.

Tableau XL

Inhibition spécifique, par les sérums anti-lectine, des effets des lectines sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours (après 24 heures de culture) et les cellules hépatiques normales et tumorales de rat (respectivement après 72 et 8 heures de culture).

	Nombre de cellules x 10^6/ml			
	Fibroblastes 10 jours	Fibroblastes 16 jours	Cellules hépatiques tumorales	Cellules hépatique normales
Témoin	4,5	1,9	0,70	5,0
Lectine de Dolichos (6 µg/ml)	2,8	2,5	0,70	5,1
Dol + Anti Con A (1:2)	2,8	2,5	-	-
Dol + anti Rob (1:2)	2,8	2,6	-	-
Dol + anti Dol				
1:5	4,5	1,9	-	-
1:25	4,0	1,9	-	-
1:50	3,4	2,2	-	-
1:100	2,9	2,6	-	-
Concanavaline A (6 µg/ml)	2,9	2,5	0,25	7,2
Con A + anti Dol (1:2)	2,9	2,5	0,25	7,1
Con A + anti Rob (1:2)	2,9	2,5	0,25	7,1
Con A + anti Con A				
1:5	4,2	1,8	0,68	5,1
1:25	4,1	1,9	0,65	5,8
1:50	3,8	2,5	0,42	6,6
1:100	2,8	2,5	0,25	7,1
Lectine de Robinia (6µg/ml)	2,9	2,5	0,25	9,0
Rob + anti Dol (1:2)	2,9	2,5	0,25	9,0
Rob + anti Con A (1:2)	2,9	2,5	0,25	9,0
Rob + anti Rob				
1:5	4,3	1,8	0,68	5,1
1:25	4,1	1,9	0,66	6,4
1:50	3,5	2,3	0,48	7,9
1:100	2,9	2,5	0,25	9,0

Les sérums anti-lectine sont utilisés à des dilutions variant du 1:2 au 1:100.
Les abréviations utilisées sont les suivantes :
Dol : lectine de Dolichos ; anti Dol : sérum anti lectine de Dolichos
Con A : Concanavaline A ; anti Con A : sérum anti-Concanavaline A
Rob : lectine de Robinia ; anti-Rob : sérum anti-lectine de Robinia

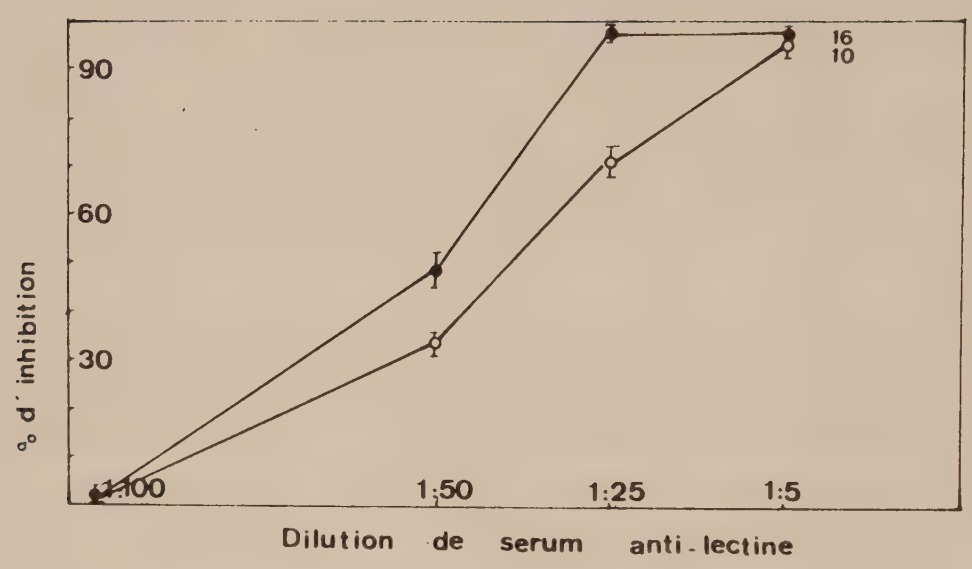


Figure 28 Inhibition spécifique, par le sérum anti-lectine de Dolichos, de l'activité de la lectine de Dolichos, sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours après 24 heures de culture.
Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité de la lectine.
Les dilutions de sérum anti lectine varient de 1:100 à 1.5 pour 19,5 µg de lectine.

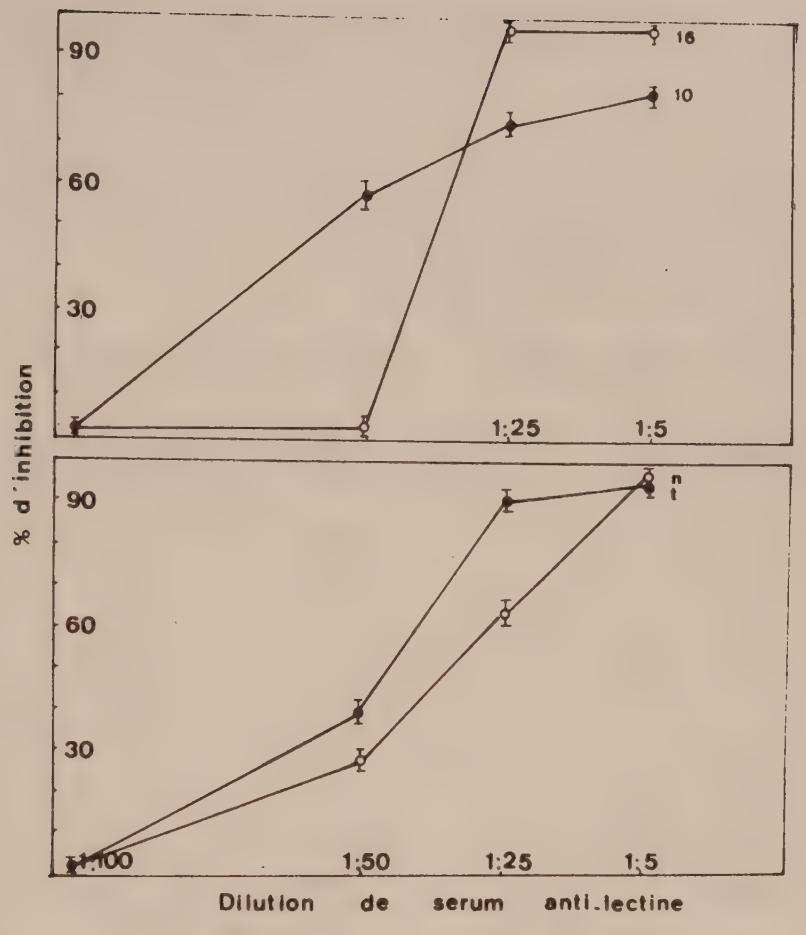


Figure 29 Inhibition spécifique, par le sérum anti-Concanavaline A, de l'activité de la Concanavaline A, sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours après 24 heures de culture, et des cellules hépatiques normales (n) et tumorales (t) de rat respectivement après 72 et 8 heures de culture.
Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité de la Concanavaline A.
Les dilutions de sérum anti-lectine varient de 1:100 à 1/5 pour 19,5 µg de lectine.

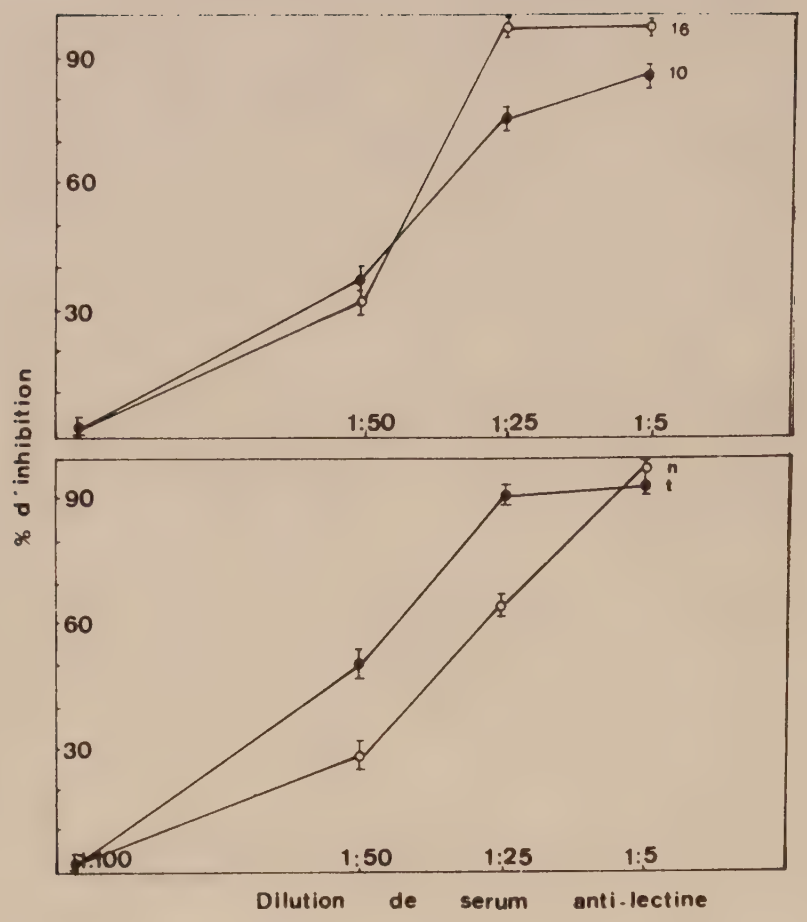


Figure 30 Inhibition spécifique, par le sérum anti-lectine de Robinia, de l'activité de la lectine de Robinia, sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours après 24 heures de culture , et des cellules hépatiques normales (n) et tumorales (t) de rat respectivement après 72 et 8 heures de culture.
Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité de la lectine.
Les dilutions de sérum anti-lectine varient de 1:100 à 1:5 pour 19,5 µg de lectine.

Tableau XLI

Comparaison de la dilution d'immun sérum nécessaire pour inhiber à 80 % l'activité de la lectine homologue sur la croissance des fibroblastes d'embryon de poulet de 10 et de 16 jours (après 24 heures de culture), et les cellules hépatiques normales et tumorales de rat (respectivement après 72 et 8 heures de culture).

	Dilution d'immun sérum nécessaire pour inhiber l'activité de la lectine homologue (19,5 µg).			
	Fibroblastes 10 jours	Fibroblastes 16 jours	Cellules hépatiques tumorales	Cellules hépatiques normales
Sérum anti-lectine de Dolichos	1 : 5	1 : 25	-	-
Sérum anti-Concanavaline A	1 : 5	1 : 25	1 : 25	1 : 5
Sérum anti-lectine de Robinia	1 : 5	1 : 25	1 : 25	1 : 5

III MECANISME D'ACTION DES LECTINES

Pour expliquer le mécanisme d'action des lectines sur la croissance cellulaire, deux hypothèses ont été explorées. La première de ces hypothèses met en jeu l'action cytotoxique des lectines, telle qu'elle a été observée dans le cas de cellules cancéreuses (DENT 1971). La seconde hypothèse met en cause une modification de la perméabilité cellulaire facilitant la pénétration dans les cellules de certains composants du milieu (BERG et BETEL 1971).

A - Etude de l'action toxique des lectines

1. Etude de l'effet léthal des lectines

Au cours de l'étude de l'action des lectines sur la croissance cellulaire, le pourcentage de cellules mortes est évalué dans les cultures témoins et dans les cultures traitées par les lectines.

Le pourcentage de cellules mortes est compris entre 4 et 6 %, et entre 8 et 10 %, respectivement dans les cultures de cellules hépatiques normales et tumorales de rat.

Le pourcentage de cellules mortes est de 5 à 8 %, respectivement dans les cultures de fibroblastes de jeunes embryons (8-10 jours) et de fibroblastes d'embryons plus âgés (12-16 jours).

Les lectines de Robinia et de Dolichos, ainsi que la Concanavaline A, à des concentrations variant de 3 à 100 µg/ml, ne modifient pas ces pourcentages. Les lectines n'ont donc pas d'effet léthal sur les cellules.

2. Etude de l'effet toxique des lectines

Dans le cas où une diminution de la croissance cellulaire est observée dans les cultures traitées par les lectines, l'hypothèse d'une action toxique des lectines parait plausible. Cette action se traduirait par une lyse cellulaire (INBAR et al 1972). Cette lyse touchant un certain pourcentage de cellules initialement ensemencées, la croissance cellulaire, telle que nous l'estimons, s'en trouverait d'autant diminuée.

Dans le cas des fibroblastes d'embryon de poulet de 8 et de 10 jours, et après 5 heures de traitement par les lectines de Robinia, de Dolichos ou la Concanavaline A, à des concentrations variant de 3 à 100 µg/ml, aucune lyse significative des cellules n'est observée. En effet, le nombre de cellules par millilitre est respectivement 0,47 et de 0,46 x 10^6 (Tableau XLII,

Tableau XLII

Action toxique de la lectine de Robinia, à différentes concentrations, sur les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement. L'effet toxique est déterminé à partir du nombre de cellules, après 5 heures de traitement dans les conditions expérimentales décrites dans "Matériel et Méthodes". La concentration cellulaire initiale est de 0,50 x 10^6 cellules/ml

Lectine de Robinia + µg/ml	Nombre de cellules x 10^6/ml — Age de l'embryon en jours			
	8	10	12	16
0	0,47	0,46	0,45	0,45
3	0,47	0,46	0,45	0,45
6	0,47	0,46	0,45	0,45
10	0,47	0,46	0,45	0,45
50	0,46	0,46	0,46	0,45
100	0,46	0,46	0,45	0,46

+ Dans le cas de la lectine de Dolichos et de la Concanavaline A, les résultats sont identiques.

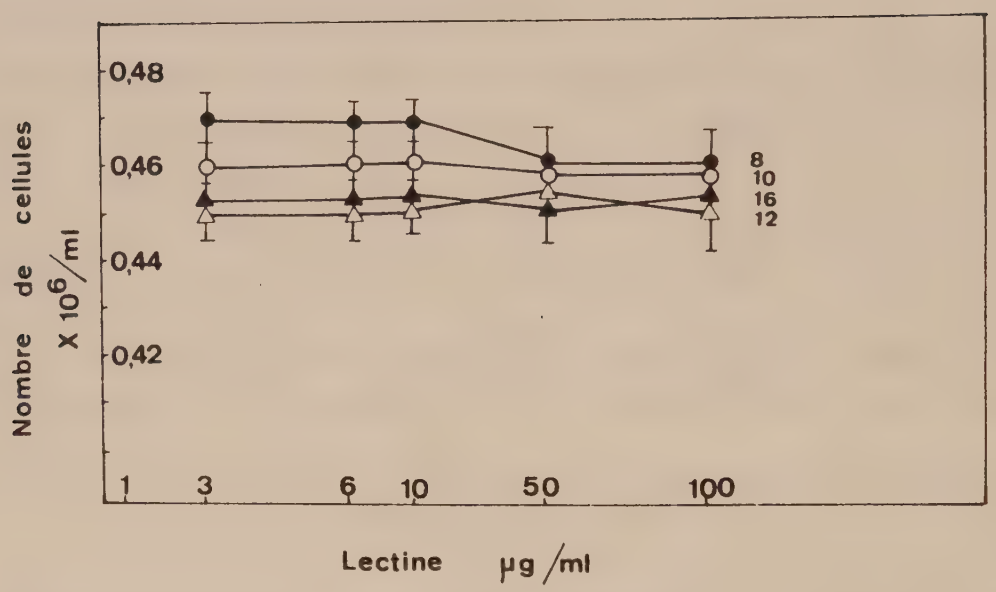


Figure 31 Action toxique de la lectine de Robinia, à différentes concentrations, sur les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement. La concentration cellulaire initiale est de 0,5 x 10^6 cellules/ml. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules après 5 heures de traitement par la lectine de Robinia.

fig 31). Dans les cultures de fibroblastes d'embryons de 12 et de 16 jours traités par les lectines, le nombre de cellules est de 0,45 x 10^6/ml. Par rapport au nombre de cellules initialement ensemencées (0,50 x 10^6/ml) ces valeurs représentent au maximum une différence de 10 %.

Dans le cas des cellules hépatiques tumorales de rat, le nombre de cellules initialement ensemencées est de 0,25 x 10^6/ml. Après une heure de culture, le nombre de cellules atteint 0,3 x 10^6/ml dans les cultures témoins et dans les cultures traitées par la lectine de Robinia ou par la Concanavaline A. Cette croissance très rapide des cellules rend une étude de l'effet toxique des lectines très difficile sinon impossible.

Dans les cultures traitées par les lectines, le nombre de cellules ne varie pas de la 2ème à la 4ème heure (0,40 x 10^6/ml), puis diminue de 25 % entre la 4ème et la 6ème heure, ce qui pourrait traduire une action toxique tardive des lectines sur les cellules. Cependant l'activité métabolique des cellules après 6 heures de culture en présence de lectines est élevée, ce qui semble exclure cet effet toxique.

3. Effet des lectines sur l'adhésivité des cellules au substrat

L'effet des lectines pourrait se manifester au niveau de l'adhésivité cellulaire au substrat. Sa diminution entrainerait celle de la croissance des cellules. Cette hypothèse est-plausible dans le cas des fibroblastes d'embryon de poulet qui adhèrent au substrat, mais pas dans des cellules hépatiques tumorales de rat qui ne possèdent pas cette propriété.

L'adhésivité au substrat est appréciée par le pourcentage des cellules initialement ensemencées qui ont adhéré au substrat.

Cependant, les lectines de Robinia et de Dolichos et la Concanavaline A à des concentrations variant de 3 à 100 µg/ml, ne modifient pas l'adhésivité des fibroblastes d'embryon de poulet de 8, 10, 12 et 16 jours ; après 3 heures d'incubation en présence de lectine, l'adhésivité au substrat est respectivement de 92, 90, 88 et 86 % comme dans le cas des cellules témoins (tableau XLIII).

4. Effet des lectines sur l'incorporation d'uridine tritiée par cellule

Une diminution de l'incorporation d'uridine tritiée exprimée en désintégrations par minute pour un million de cellules (dpm/10^6 cellules), pourrait traduire une diminution de l'activité métabolique générale de la cellule résultant d'un effet toxique des lectines.

A des concentrations variant de 3 à 50 µg/ml, la lectine de Robinia et la Concanavaline A ne diminuent pas l'incorporation d'uridine tritiée

Tableau XLIII

Action de la lectine de Robinia, à différentes concentrations, sur l'adhésivité au substrat des fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement. L'adhésivité au substrat est exprimée en pourcentage du nombre de cellules qui ont adhéré par rapport au nombre de cellules initialement ensemencées (après 3 heures d'incubation à 37°C dans les conditions de culture).

Lectine de Robinia + (µg/ml)	Adhésivité au substrat en % — Age de l'embryon en jours			
	8	10	12	16
0	92	90	88	86
3	92	90	88	86
6	92	90	88	85
10	91	88	88	85
50	90	89	88	85
100	90	88	86	85

+ Dans le cas de la lectine de Dolichos et de la Concanavaline A, les résultats sont identiques.

dans les cellules hépatiques tumorales de rat. Au contraire, les résultats précédemment obtenus (Chapitre I, paragraphe D) montrent qu'après 6 heures de culture, cette incorporation est stimulée de plus de 100 % par les lectines (tableau XXXI).
A la concentration de 100 µg/ml, les lectines ne stimulent plus que très faiblement (8 à 16 %) l'incorporation d'uridine tritiée, cependant sans la diminuer.

A des concentrations variant de 3 à 50 µg/ml, les lectines de Robinia et de Dolichos, et la Concanavaline A stimulent l'incorporation d'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet de 8 et de 10 jours. Les résultats précédemment obtenus (chapitre I, paragraphe D) montrent qu'après 24 heures de culture, cette stimulation est au maximum de 41 %. A ces concentrations, les lectines ne modifient pas l'incorporation d'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryons de 12 et de 16 jours (tableau XXXII).

A la concentration de 100 µg/ml, les lectines, à l'exception de la lectine de Dolichos, diminuent l'incorporation d'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryons de 8 jours ; cette diminution est de 48 % pour la Concanavaline A et de 22 % pour la lectine de Robinia. De même, l'incorporation d'uridine tritiée est diminuée (38-42 %) dans les fibroblastes d'embryon de 16 jours, par ces deux lectines. Il est observé que les cellules d'embryon de 10 jours ne sont pas sensibles à l'effet toxique de doses importantes de lectine (100 µg), et que les cellules d'embryon de 12 jours le sont peu (tableau XXXII).

Or, les lectines ont une action optimale sur la croissance cellulaire pour des concentrations de 3 à 6 µg/ml. A des concentrations variant de 3 à 50 µg/ml, les lectines n'ont aucun effet toxique. Cette hypothèse, émise pour expliquer le mécanisme d'action des lectines, semble donc exclue.

B - Action des lectines sur la perméabilité cellulaire

La perméabilité à la thymidine et à l'uridine tritiées est étudiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat, et dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement. La perméabilité cellulaire est égale à la somme du précurseur incorporé dans le matériel acido-insoluble et dans le matériel acido-soluble (STAMBROOK et al 1973) pendant un temps donné.

1. Action des lectines sur la perméabilité à la thymidine tritiée

Les lectines de Robinia et de Dolichos, ainsi que la Concanavaline A sont ajoutées aux cultures à la concentration finale de 6 µg/ml. La thymidine

est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules (dpm/10^6 cellules).

a) Cellules hépatiques tumorales de rat

Dans les cellules témoins, l'incorporation de thymidine tritiée augmente en fonction du temps, dans le matériel acido-insoluble et non dans le matériel acido-soluble. La perméabilité cellulaire à la thymidine tritiée augmente pour des temps variant de 5 à 30 minutes (tableau XLIV, fig 32).

La lectine de Robinia et la Concanavaline A ne modifient pas la perméabilité cellulaire à la thymidine tritiée (tableau XLIV, fig 32).

b) Fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

Dans les fibroblastes d'embryon de poulet témoins, l'incorporation de thymidine tritiée augmente en fonction du temps, dans le matériel acido-insoluble et dans le matériel acido-soluble (tableau XLV). La perméabilité à la thymidine tritiée augmente pour des temps variables de 15 minutes à 4 heures, et n'est pas modifiée par les lectines de Robinia, de Dolichos et la Concanavaline A (tableaux XLV, XLVI, fig 33).

2. Action des lectines sur la perméabilité à l'uridine tritiée

Les lectines de Robinia et de Dolichos, ainsi que la Concanavaline A sont ajoutées aux cultures à la concentration finale de 6 µg/ml. L'uridine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules (dpm/10^6 cellules).

a) Cellules hépatiques tumorales de rat

Dans les cellules témoins, l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-soluble est plus importante que dans le matériel acido-insoluble. La perméabilité à l'uridine tritiée augmente pour des temps variant de 15 minutes à 4 heures.

La lectine de Dolichos ne modifie pas la perméabilité cellulaire à l'uridine tritiée (tableau XLVII).

La lectine de Robinia et la Concanavaline A diminuent la perméabilité à l'uridine tritiée ; cette diminution est faible mais significative ; elle atteint 13, 16, 16 et 11 %, respectivement après 5, 10, 15 et 30 minutes. La diminution de la perméabilité à l'uridine tritiée est plus marquée pour le matériel acido-insoluble que pour le matériel acido-soluble ; en effet la diminution observée est de 25 % dans le premier cas et de 12 % dans le

Tableau XLIV

Action des lectines, en fonction du temps, sur la perméabilité à la thymidine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat. La thymidine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules (dpm/10^6 cellules).

Temps en minutes	dpm x $10^3/10^6$ cellules											
	Témoin			lectine de Robinia (6µg/ml)			Concanavaline A (6 µg/ml)			Lectine de Dolichos (6 µg/ml)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
5	0,9	9,9	10,8	0,9	9,4	10,3	0,9	9,5	10,4	0,9	9,5	10,4
10	2,5	10,8	13,3	2,4	10,2	12,6	2,3	10,8	13,1	2,4	10,2	12,6
15	4,5	10,9	15,4	4,5	10,7	15,2	4,4	10,8	15,3	4,3	10,5	14,8
30	7,7	9,7	17,4	7,8	9,6	17,4	7,6	9,8	17,4	7,8	9,6	17,4

A : Thymidine tritiée dans le matériel acido-insoluble

B : Thymidine tritiée dans le matériel acido-soluble

C : Perméabilité à la thymidine tritiée (C = A + B)

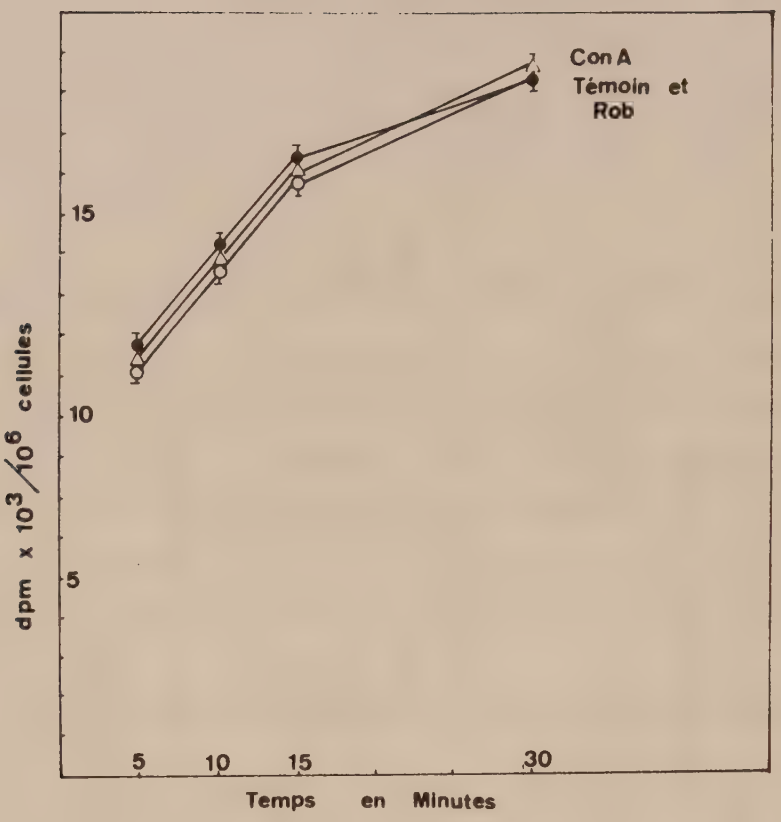


Figure 32 Action de la lectine de Robinia (Rob) et de la Concanavaline A (Con A), en fonction du temps, sur la perméabilité à la thymidine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

Tableau XLV

Action des lectines, en fonction du temps, sur la perméabilité à la thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet de 8 et de 10 jours. La thymidine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules (dpm/10^6 cellules)

Age de l'embryon en jours	Temps en heures	dpm x $10^3/10^6$ cellules											
		Témoin			Lectine de Robinia (6 µg/ml)			Concanavaline A (6 µg/ml)			lectine de Dolichos (6 µg/ml)		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
8	1/4	2,7	2,3	5,0	2,6	2,3	4,9	2,6	2,3	4,9	2,6	2,4	5,0
	1/2	3,3	3,2	6,5	3,2	3,2	6,4	3,2	3,3	6,5	3,2	3,2	6,4
	1	3,9	3,3	7,2	3,8	3,4	7,2	3,8	3,3	7,1	3,9	3,4	7,3
	2	7,8	3,8	11,6	7,7	3,6	11,3	7,7	3,6	11,3	7,7	3,6	11,3
	3	12,8	3,9	16,7	12,8-	3,8	16,6	13,0	3,9	16,9	12,8	3,8	16,6
	4	14,5	4,1	18,6	13,9	4,0	17,9	13,9	3,9	17,8	14,6	3,9	18,5
10	1/4	0,7	2,3	3,0	0,7	2,4	2,9	0,7	2,3	3,0	0,8	2,3	3,1
	1/2	1,9	4,8	6,7	1,8	4,8	6,7	1,9	4,7	6,6	1,8	4,7	6,6
	1	3,5	4,0	7,5	3,5	3,9	7,4	3,5	3,9	7,4	3,6	3,9	7,5
	2	5,8	6,8	12,6	5,8	6,8	12,6	5,7	7,0	12,7	5,7	6,8	12,5
	3	9,1	7,2	16,3	9,3	7,3	16,6	9,2	7,3	16,6	9,2	7,4	16,6
	4	9,1	11,1	20,2	9,0	11,2	20,2	9,1	11,0	20,1	9,3	11,2	20,5

A : Thymidine tritiée dans le matériel acido-insoluble

B : Thymidine tritiée dans le matériel acido-soluble

C : Perméabilité à la thymidine tritiée (C = A + B)

Tableau XLVI

Action des lectines, en fonction du temps, sur la perméabilité à la thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet de 12 et de 16 jours. La thymidine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules (dpm/10^6 cellules).

Age de l'embryon en jours	Temps en heures	dpm x $10^3/10^6$ cellules											
		Témoin			lectine de Robinia (6 µg/ml)			Concanavaline A (6 µg/ml)			lectine de Dolichos (6µg/ml)		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
12	1/4	0,8	2,4	3,2	0,8	2,5	3,3	0,8	2,4	3,2	0,9	2,5	3,4
	1/2	2,2	4,4	6,6	2,2	4,5	6,7	2,3	4,5	6,8	2,3	4,6	6,9
	1	3,1	4,1	7,2	3,1	4,3	7,4	3,1	4,2	7,3	3,0	4,3	7,3
	2	5,6	5,4	11,0	5,7	5,6	11,3	5,7	5,4	11,1	5,7	5,5	11,2
	3	8,6	6,2	14,8	8,6	6,2	14,8	8,6	6,2	14,8	8,5	6,1	14,6
	4	10,2	8,1	18,3	10,1	8,1	18,2	10,1	8,2	18,3	10,2	8,2	18,4
16	1/4	1,0	2,5	3,5	1,0	2,6	3,6	1,0	2,6	3,6	1,0	2,4	3,4
	1/2	2,9	3,6	6,5	2,9	3,6	6,5	2,8	3,6	6,4	2,8	3,7	6,5
	1	4,2	3,8	8,0	4,3	3,7	8,0	4,2	3,8	8,0	4,3	3,6	7,9
	2	6,4	4,8	11,2	6,3	4,6	10,9	6,4	4,7	11,1	6,3	4,8	11,1
	3	11,9	5,9	17,8	11,8	5,8	17,6	12,0	5,9	17,9	11,8	5,9	17,7
	4	11,3	6,1	17,4	11,2	6,0	17,2	11,3	6,0	17,3	11,0	6,1	17,1

A : thymidine tritiée dans la matériel acido-insoluble

B : thymidine tritiée dans la matériel acido-soluble

C : perméabilité à la thymidine tritiée (C = A + B)

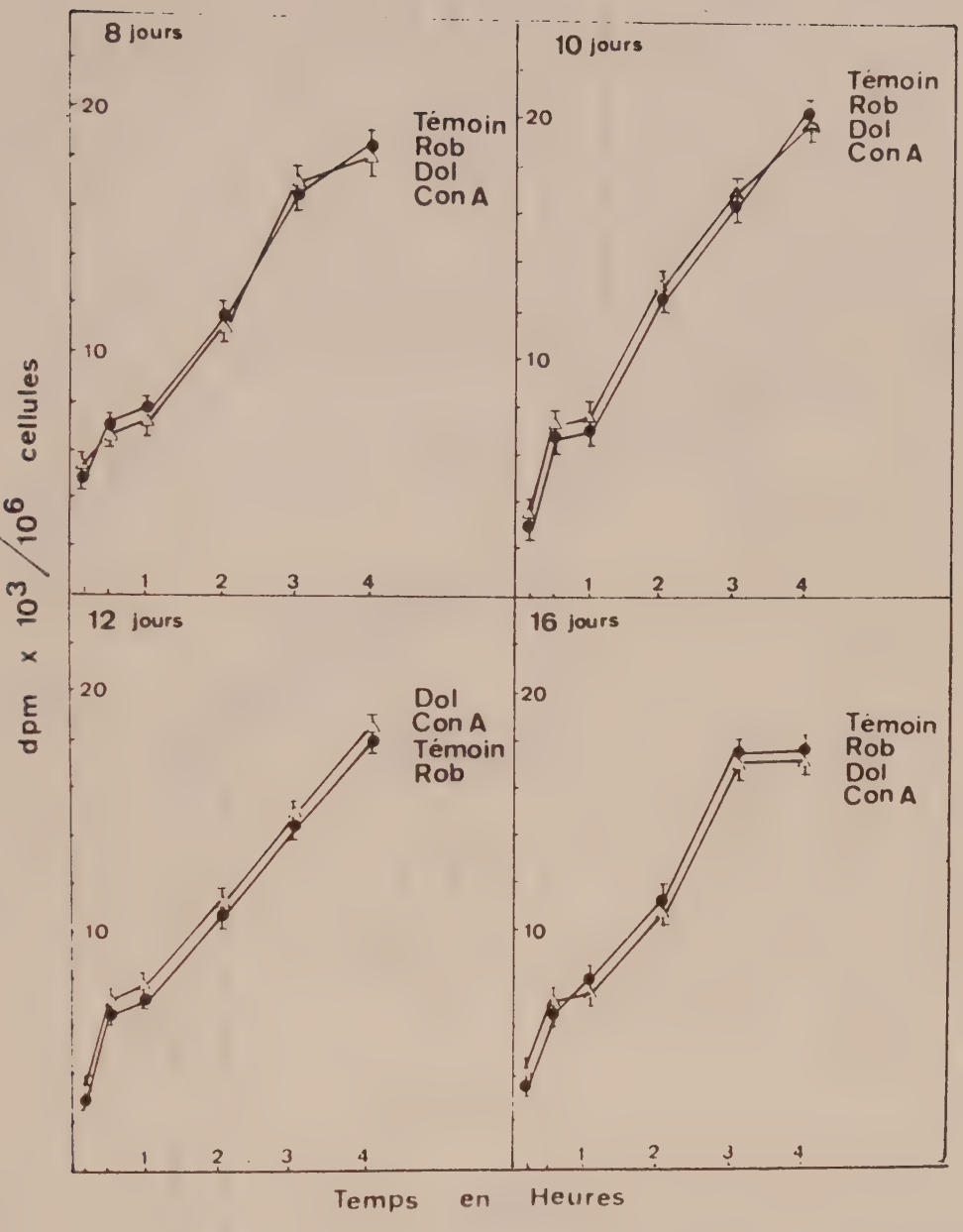


Figure 33 Action des lectines de Robinia (Rob) et de Dolichos (Dol) ainsi que de la Concanavaline A (Con A) en fonction du temps, sur la perméabilité à la thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement.
Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

Tableau XLVII

Action des lectines, en fonction du temps, sur la perméabilité à l'uridine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat. L'uridine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules (dpm/10^6 cellules).

Temps en minutes	dpm x 10^3 / 10^6 cellules											
	Témoin			Lectine de Dolichos (6 µg/ml)			Concanavaline A (6 µg/ml)			Lectine de Robinia (6 µg/ml)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
5	0,8	45,8	46,6	0,8	45,9	46,7	0,6	40,2	40,8	0,6	40,1	40,7
10	1,7	58,6	60,3	1,8	57,8	59,6	1,6	49,2	50,8	1,6	49,3	50,9
15	3,7	70,1	73,8	3,6	69,8	73,4	3,1	59,1	62,2	3,1	58,9	62,0
30	9,1	106,5	115,6	8,9	106,6	115,5	6,2	96,7	102,9	6,2	96,7	102,9

A : Uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble

B : Uridine tritiée dans le matériel acido-soluble

C : Perméabilité à l'uridine tritiée (C = A + B)

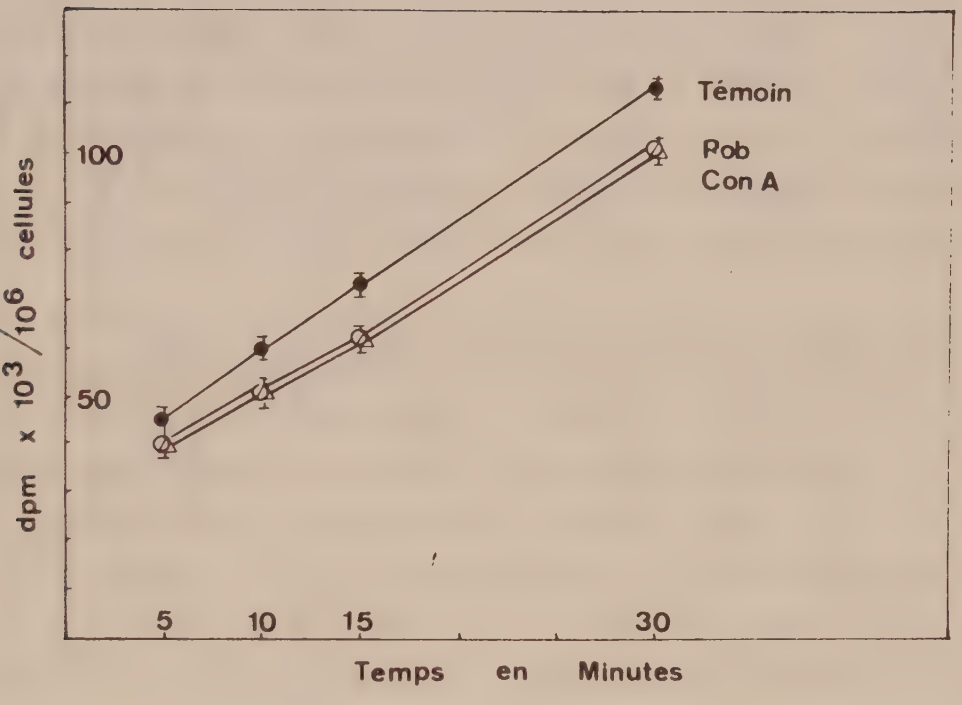


Figure 34 Action de la lectine de Robinia (Rob) et de la Concanavaline A (Con A) en fonction du temps, sur la perméabilité à l'uridine tritiée dans les cellules hépatiques tumorales de rat. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

second, après 5 minutes (tableau XLVII, fig. 34).

b) fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement

Dans les fibroblastes d'embryon de 8, 10, 12 et 16 jours, l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-soluble est plus importante que dans le matériel acido-insoluble. La perméabilité cellulaire à l'uridine tritiée augmente pour des temps variant de 15 minutes à 4 heures (tableaux XLVIII, XLIX). Les lectines diminuent la perméabilité à l'uridine tritiée ; après 15 minutes, cette diminution atteint respectivement 22 à 23 % dans les cellules de 8 jours, et 14 à 15 % dans les cellules de 10 jours (tableau XLVIII). La diminution d'incorporation d'uridine tritiée induite par les lectines, est plus marquée dans le matériel acido-insoluble, que dans le matériel acido-soluble. Après 4 heures, la diminution de la perméabilité à l'uridine tritiée atteint 28 à 33 % pour les fibroblastes d'embryon de 8 jours, et de 23 à 28 % pour les fibroblastes d'embryon de 10 jours (tableau XLVIII, fig 35).

Les lectines ne modifient pas la perméabilité à l'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de 12 jours après 15 et 30 minutes. Après 1 heure, les lectines diminuent la perméabilité de 11 à 17 % ; cette diminution est respectivement de 25 % dans le matériel acido-insoluble et de 11 à 17 % dans le matériel acido-soluble. Après 4 heures, la diminution de la perméabilité à l'uridine tritiée est de 20 % (Tableau XLIX, fig 36).

Les lectines ne modifient pas la perméabilité à l'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de 16 jours après 15 et 30 minutes, ou après 1 heure.

Après 2 heures, les lectines diminuent la perméabilité à l'uridine tritiée de 13 % ; cette diminution est observée uniquement dans le matériel acido-soluble.

Après 3 heures, les lectines stimulent la perméabilité à l'uridine tritiée de 20 à 22 % ; cette stimulation est respectivement de 20 % dans le matériel acido-insoluble et de 12 à 14 % dans le matériel acido-soluble. Après 4 heures, les lectines stimulent de 14 % l'incorporation d'uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble, mais ne modifient pas de façon significative, l'incorporation dans le matériel acido-soluble ou la perméabilité (tableau XLIX, fig. 36).

Tableau XLVIII

Action des lectines, en fonction du temps, sur la perméabilité à l'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet de 8 et de 10 jours. L'uridine tritiée est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules (dpm/10^6 cellules).

Age de l'embryon en jours	Temps en heures	dpm x $10^3/10^6$ cellules											
		Témoin			Lectine de Robinia (6 µg/ml)			Concanavaline A (6 µg/ml)			Lectine de Dolichos (6 µg/ml)		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
8	1/4	6	55	61	3	44	47	4	44	48	4	43	47
	1/2	8	71	79	5	59	64	5	60	65	5	60	65
	1	11	98	109	7	84	91	7	81	88	7	89	96
	2	21	114	135	13	87	100	13	91	104	13	84	97
	3	32	134	166	21	98	119	21	97	118	21	106	127
	4	44	138	182	26	107	133	25	98	123	26	99	125
10	1/4	4	47	51	3	41	44	3	37	40	3	38	41
	1/2	7	66	73	5	54	59	5	50	55	5	55	60
	1	7	112	119	5	93	98	5	102	107	5	101	106
	2	14	113	124	8	96	104	8	98	106	8	98	106
	3	18	113	121	12	87	109	11	84	95	11	93	104
	4	25	147	172	15	111	126	15	111	126	16	117	123

A : uridine tritiée dans la matériel acido-insoluble

B : uridine tritiée dans le matériel acido-soluble

C : perméabilité à l'uridine tritiée (C = A + B)

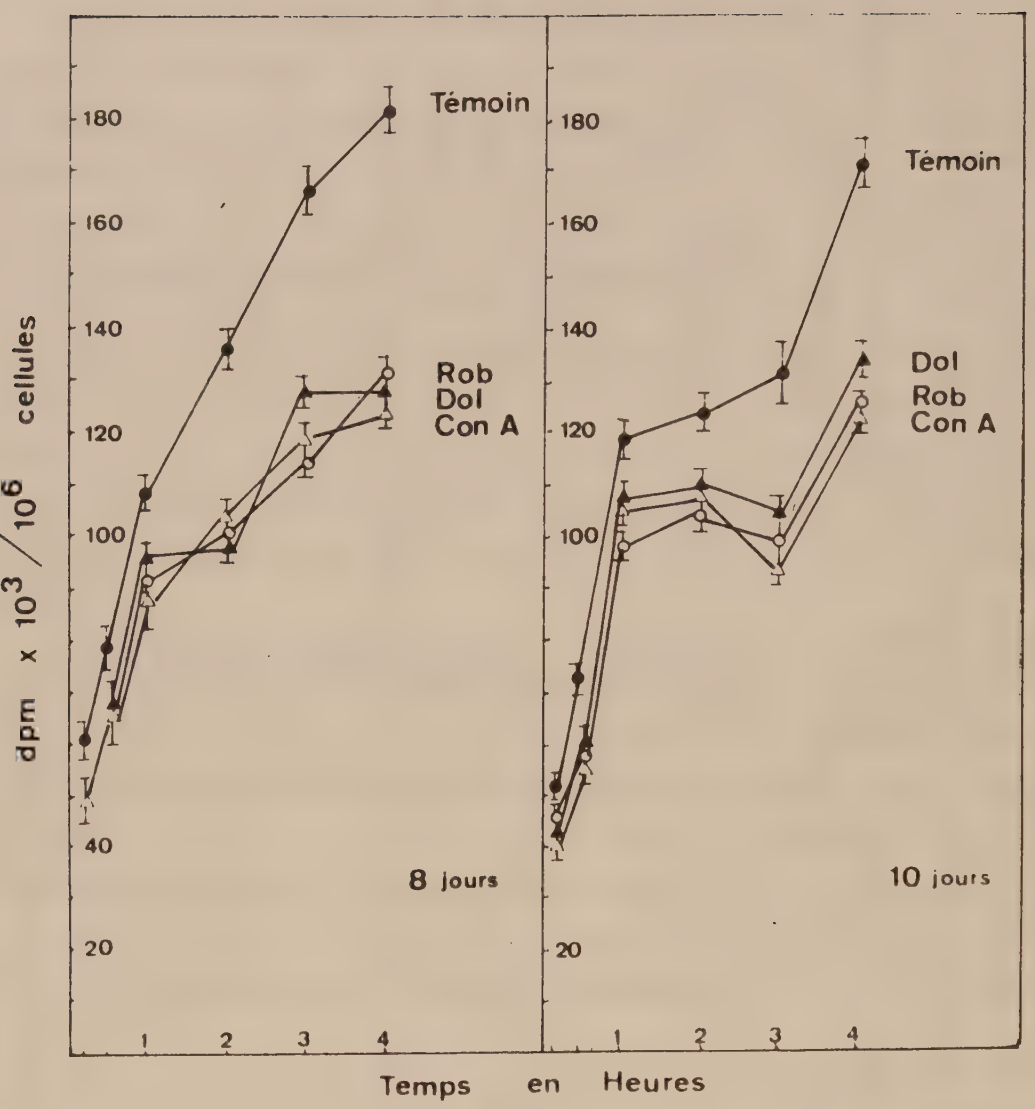


Figure 35 Action des lectines de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A) en fonction du temps sur la perméabilité à l'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet de 8 et de 10 jours. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

Tableau XLIX

Action des lectines, en fonction du temps, sur la perméabilité à l'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet de 12 et de 16 jours. L'uridine est ajoutée au temps zéro de la culture. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules (dpm/10^6 cellules).

Age de l'embryon en jours	Temps en heures	dpm x $10^3/10^6$ cellules											
		Témoin			Lectine de Robinia (6 µg/ml)			Concanavaline A (6 µg/ml)			lectine de Dolichos (6 µg/ml)		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
12	1/4	2	40	42	2	40	42	2	40	42	2	40	42
	1/2	3	54	57	3	53	56	3	53	56	3	53	56
	1	4	142	146	3	118	121	3	119	122	3	127	130
	2	6	126	132	5	119	124	5	120	125	5	119	124
	3	9	131	140	7	126	133	7	131	138	7	133	140
	4	10	151	161	8	120	128	8	129	137	8	122	130
16	1/4	1	30	31	1	31	32	1	31	32	1	30	31
	1/2	2	50	52	2	57	59	2	53	55	2	53	55
	1	3	134	137	3	131	134	3	127	130	3	131	134
	2	5	146	151	5	131	136	5	127	132	5	134	139
	3	5	167	172	6	188	194	6	187	193	6	191	197
	4	7	190	197	8	188	196	8	186	194	8	185	193

A : uridine tritiée dans le matériel acido-insoluble

B : uridine tritiée dans la matériel acido-soluble

C : perméabilité à l'uridine tritiée (C = A + B)

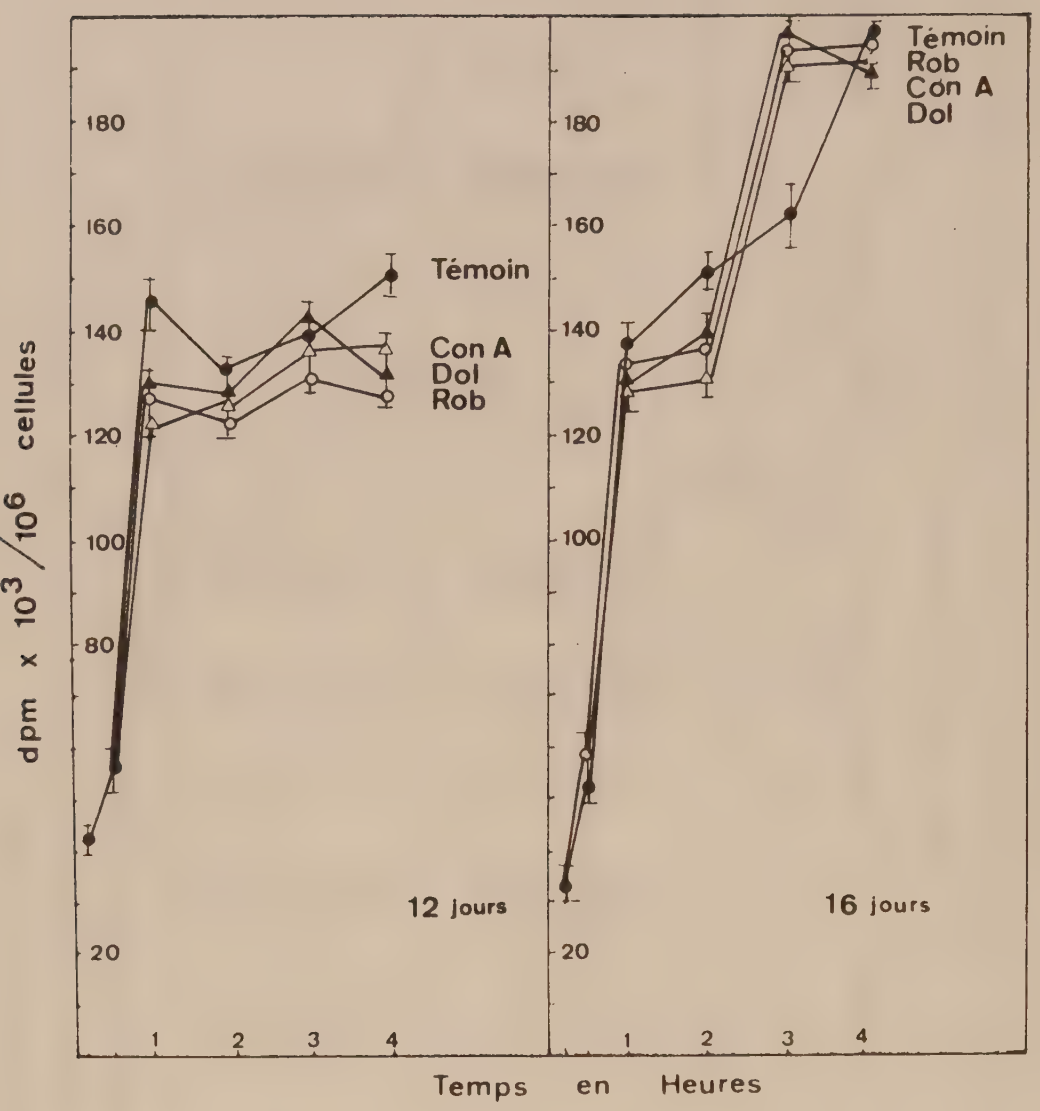


Figure 36 Action de la lectine de Robinia (Rob), de Dolichos (Dol) et de la Concanavaline A (Con A) en fonction du temps, sur la perméabilité à l'uridine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de 12 et de 16 jours.
Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute pour un million de cellules.

DISCUSSION

DISCUSSION

De nombreux travaux ont cherché à préciser la ou les différences morphologiques, immunologiques, génétiques et biochimiques entre les cellules normales et transformées.

Les différences de croissance de ces cellules en culture et de leur agglutinabilité par les lectines ont suscité de nombreuses études et l'élaboration de "modèles" qui ne cernent pas toujours le phénomène spontané de la transformation cellulaire.

Dans ce type d'études, le choix des cellules est primordial. Généralement les études sont effectuées sur des cellules en lignées continues, ce qui présente l'avantage de disposer d'une population homogène de cellules isolées, adaptées aux conditions de vie in vitro, qui peuvent se multiplier en suspension ou en monocouche, indépendamment d'une concentration cellulaire initiale stricte. Mais ces cellules présentent le grave inconvénient d'être très dédifférenciées et rapidement de ne plus ressembler aux cellules des tissus dont elles proviennent. Ce sont souvent des cellules polyploides dont le métabolisme diffère de celui des cellules parentes originelles.

Seulement, un petit nombre d'études est effectué sur des cellules fraichement prélevées et cultivées en primo-culture. Les cellules ainsi prélevées ont l'avantage considérable de conserver leurs propriétés et leurs caractéristiques "normales". Cependant, leur population est souvent hétérogène et non adaptée aux conditions de vie in vitro, ce qui exige des conditions strictes de culture. En outre, elles proviennent souvent d'un tissu, donc résultent d'une dissociation qui peut endommager plus ou moins la membrane de surface ; ces cellules se multiplient généralement en monocouche, car elles exigent un substrat pour croître ; toutefois les cellules tumorales en primo-cultures prolifèrent en suspension à condition que la concentration cellulaire initiale soit élevée.

Les différences entre les cellules normales et transformées ont été explorées par des techniques spécialisées, plutôt que par des actions concertées. Peut-être faut-il voir là la modicité des résultats obtenus.

De nombreux travaux se sont intéressés aux différences morphologiques mais celles-ci ne sont pas univoques et diffèrent considérablement selon le type de cellules (OBERLING et BERNHARD 1955, 1961).

C'est pourquoi des études chimiques et surtout des études sur le comportement des cellules modifiées par la transformation tumorale ou embryonnaire, ont été entreprises. A cet égard une voie d'étude a récemment attiré l'attention, qui fait intervenir des agglutines végétales, les lectines, comme marqueurs et comme sondes dans la détermination des différences entre cellules normales et transformées (NICOLSON 1974, SHARON et LIS 1974, BOURRILLON 1975). L'observation essentielle réside dans l'agglutinabilité préférentielle des cellules transformées par les virus à ADN, comparée aux cellules normales homologues (AUB et al. 1965 a et b). Comme les surfaces cellulaires ont été impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire (WALLACH 1968, PARDEE 1971, EMMELOT 1973), donc dans les différences de croissance des cellules normales et transformées, et comme les lectines ne peuvent agir qu'après interaction avec les surfaces cellulaires (BOURRILLON 1973, 1975 ; NICOLSON 1974), le système lectine-cellules-agglutination pouvait constituer un modèle pour étudier la transformation cellulaire. L'agglutinabilité des cellules embryonnaires en présence de lectines, variable selon l'âge de l'embryon (MOSCONA 1971) augmentait encore l'intérêt de ce modèle. Etant données les spécificités variées des lectines (MAKELA 1957 ; LIS et SHARON 1972), il paraissait possible d'explorer les modifications des structures chimiques des membranes cellulaires responsables de la transformation cellulaire. De nombreux et intéressants travaux ont été effectués dans ce sens avec ce modèle et les résultats obtenus, encore limités sont rapportés dans plusieurs revues générales récentes (SHARON et LIS 1972, SHARON et LIS 1974, NICOLSON 1974).

Pour intéressants que soient les résultats concernant l'agglutinabilité des cellules, ils sont limités, et il est nécessaire de disposer d'un autre moyen d'exploration des différences entre cellules normales et transformées.

L'étude de la croissance des cellules en cultures parait être un test convenable, puisque l'une des différences essentielles entre les cellules normales et transformées réside dans leur courbe de croissance cellulaire. Comme dans le cas de l'agglutinabilité, la prolifération des cellules en cultures, en présence de lectines, est fonction du type de cellules et de leur état physiologique.

Le modèle le plus classique est constitué par l'effet de certaines lectines dites mitogènes sur la croissance et la transformation des lymphocytes humains normaux circulants (NOWELL 1960, LING 1968). En primo-cultures, ces cellules bien différenciées sont quiescentes, ne se divisent pratiquement pas et incorporent faiblement les précurseurs des acides nucléiques, la thymidine et l'uridine (DOUGLAS 1971). Cependant les lymphocytes normaux en lignée continue se distinguent nettement des lymphocytes fraichement prélevées (SHARIF 1975) : ils se divisent activement, incorporent des quantités importantes de thymidine et présentent une morphologie lymphoblastique. Ils possèdent donc des caractéristiques peu différentes des lymphocytes leucémiques. Or, les lymphocytes normaux quiescents peuvent être stimulés, se diviser activement et se transformer en cellules lymphoblastiques sous l'influence de substances appellées mitogènes. Les plus utilisées de ces substances sont les lectines mitogènes qui provoquent ces transformations des lymphocytes normaux, mais sont généralement peu actives sur les lymphocytes leucémiques (MOREHEAD et al 1960, SHARIF 1975), bien que les études en ce domaine soient encore très limitées.

L'effet mitogénique de ces lectines sur les lymphocytes normaux a été largement étudié et a servi de modèle pour l'étude de la division cellulaire et de son contrôle. Or l'intérêt d'un modèle est de constituer une référence pouvant être appliquée à d'autres systèmes. En fait, les études des effets des lectines sur la croissance des cellules autres que les lymphocytes sont pratiquement inexistantes ; à peine peut-on signaler les observations de IOACHIM (1966) sur une stimulation par les lectines de 50 % dans la croissance des cellules du tissu conjonctif de souris en culture secondaire, les résultats de SARKANY et CARON (1965) sur la croissance des cellules épithéliales de la peau en culture organotypique stimulées de 23% par les lectines.

Ainsi, et tout au moins pour ces exemples, il est apparent que la stimulation de ces cellules par les lectines est d'intensité beaucoup plus limitée que celle des lymphocytes. Les résultats que nous avons obtenus confirment cette impression. En effet, les cellules hépatiques normales de rat, cellules très différenciées, comme les lymphocytes et qui ne se divisent pratiquement pas, ont leur croissance stimulée par les lectines mitogènes. Il en est de même de la croissance de cellules "normales" en lignée continue, les cellules de rein de hamster nouveau né (BHK 21/C13) qui est stimulée par ces lectines. Cependant les courbes de croissance de ces deux types de cellules présentent des différences. Ainsi, l'effet des lectines sur la croissance des cellules de rein de hamster nouveau né normales (BHK 21/C13) présente des fluctuations d'intensité en fonction du temps de culture, suggérant que les cellules normales en lignée se modifient au cours de la culture. Une autre différence est liée à l'activité des lectines elles-mêmes. Les lectines mitogéniques non spécifiques de groupe sanguin, telles la Concanavaline A et la lectine de Robinia, stimulent la croissance des cellules hépatiques normales de rat et les cellules BHK 21/C13.

Par ailleurs, il est généralement reconnu (DOWNING et al 1968) que les lectines spécifiques de groupe sanguin ne sont pas mitogènes ; de ce fait, la lectine de Dolichos, spécifique de groupe sanguin A1 , est sans effet sur la croissance des lymphocytes et des cellules hépatiques normales de rat. Or, à l'inverse, la lectine de Dolichos stimule la croissance des cellules BHK 21/C13 comme les autres lectines mitogènes. Ce résultat pourrait être de grand intérêt pour comprendre le mécanisme encore inconnu des effets des lectines conduisant à la mitose, en liaison avec la structure des sites récepteurs des surfaces cellulaires. En effet, la spécificité de la lectine de Dolichos est très étroite, ne reconnaissant que les macromolécules avec des résidus de N-acetylgalactosamine en position terminale non réductrice (ETZLER et KABAT 1970). Il est encore possible que les surfaces des cellules BHK 21/C13 contiennent à la surface des molécules à activité de groupe A1 ou des molécules voisines de celles-ci.

Comme dans le cas de l'agglutinabilité, les cellules normales et transformées se distinguent par la réponse de croissance à l'effet des lectines. Les cellules hépatiques tumorales de rat, provenant d'un hépatome

ascitique (hépatome de Zajdela), les cellules BHK 21/C13 transformées par le virus du polyome dont la prolifération en culture est importante, ont leur capacité de croissance considérablement diminuée par la présence de lectines "mitogènes" dans les milieux de culture. Cette action inhibitrice des lectines sur la croissance des cellules transformées avait été observée avec diverses lignées cellulaires : les cellules Hela (CASO 1966), cellules 3T3-Py (NOONAN et BURGER 1970), cellules L 1210 provenant d'un lymphome ascitique (DENT 1971). Il est intéressant de souligner que les études réalisées parallèlement sur des cellules homologues, normales (BHK 21/C13) et transformées (BHK 21/Py) ont leur croissance modifiée par les lectines de façon opposée selon leur état physiologique. Ce résultat élimine l'objection que l'effet inhibiteur des lectines sur la croissance des cellules tumorales, encore limité à un petit nombre d'observations, serait dû au type de cellules étudié et non à leur état physiologique. Il faut aussi remarquer que la lectine de Dolichos, dont les particularités ont été rappellées ci-dessus, agit sur les cellules transformées BHK 21/Py comme les autres lectines, alors qu'elle est sans effet sur la prolifération des cellules hépatiques normales et des cellules tumorales ascitiques de rat. Il serait de grand intérêt de prospecter l'effet de cette lectine sur d'autres types de cellules normales et tumorales.

Il apparait donc qu'avec quelques particularités individuelles les cellules normales et transformées, en primoculture ou en lignées, se distinguent entre elles par leur réponse à certaines lectines. Les cellules normales ne sont pas agglutinées par les lectines qui stimulent leur croissance tandis que les cellules transformées, sont agglutinées par les lectines qui ralentissent considérablement leur croissance. Or les cellules normales et transformées se distinguent par leur état de différenciation, les cellules normales étant très différenciées et les cellules tumorales ayant subi une dédifférenciation. En outre, plusieurs observations qui seront développées ultérieurement, ont depuis longtemps souligné les rapports qui pouvaient exister entre les propriétés des cellules tumorales et embryonnaires, le plus spectaculaire étant sans doute la réapparition d'antigènes foetaux au cours de certains carcinomes, surtout digestifs (GOLD et al 1968, STONEHILL et BENDICK 1968). Il apparaissait donc intéressant d'étudier le comportement des cellules embryonnaires envers les lectines à différents moments de leur différenciation, c'est-à-dire à différentes étapes de leur

développement. Comme dans le cas des cellules adultes, il a été observé des différences dans l'agglutinabilité des cellules hépatiques (KURODA 1968) et des cellules de la rétine neurale (KLEINSCHUSTER et MOSCONA 1972) d'embryon de poulet, des cellules hépatiques de l'embryon de rat (BECKER 1974), des cellules d'embryon d'oursin (KRACH et al 1973), des cellules embryonnaires intestinales (WEISER 1972) diminue généralement avec l'âge de l'embryon, bien que certaines lectines, comme celle de Ricin, sont efficaces à toutes les étapes du développement (KLEINSCHUSTER et MOSCONA 1972, KRACH et al 1973). La croissance des fibroblastes d'embryons de poulet en culture est aussi considérablement modifiée par les lectines suivant l'état de développement embryonnaire. Généralement les lectines stimulent la croissance des cellules d'embryons âgés (16e jour), mais ralentissent celle de jeunes embryons (8e jour). Il est important de souligner que les cellules hépatiques d'embryon de poulet qui proviennent comme les cellules de rétine d'un organe précocement différencié réagissant envers les lectines mitogènes comme les fibroblastes (AUBERY et BOURRILLON 1976), alors que les cellules de la rétine neurale ne se multiplient pas in vitro. Cette différence pourrait être en relation avec la capacité de réparation in vivo des cellules ; les cellules hépatiques après une hépatectomie partielle, les fibroblastes après une lésion de la peau,sont aptes à se multiplier, ce qui n'est pas le cas des cellules de la rétine neurale, en raison de son origine nerveuse.
On ne peut manquer de rapprocher ces résultats de ceux observés sur les cellules adultes. Ainsi, les cellules embryonnaires jeunes se comportent comme des cellules transformées, alors que les cellules embryonnaires plus âgées réagissent comme des cellules adultes normales envers les lectines.

La lectine de Dolichos agit sur la croissance des cellules embryonnaires comme les autres lectines "mitogènes" bien qu'à un moindre degré et l'on est tenté de rapprocher ce résultat de celui observé avec la même lectine sur la croissance des cellules adultes. Sans effet sur la croissance des lymphocytes et des cellules hépatiques de rat, cellules en primoculture, elle est au contraire efficace sur la croissance des cellules BHK 21/C13 et BHK 21/Py en lignée continue. Or les cellules BHK 21/C13 sont des cellules de hamster nouveau né donc proche de l'état foeto-embryonnaire. L'effet de la lectine de Dolichos sur le comportement des cellules en culture pourrait

donc être relié soit à la nature de la culture, continue ou primoculture, soit à l'état de développement des cellules. L'origine des cellules BHK 21/C13, l'observation de OIKAWA et al (1974) sur le blocage de la fertilisation des oeufs de mammifères par la lectine de Dolichos militent plutôt en faveur de la deuxième hypothèse. Il pourrait donc y avoir une relation entre l'état embryonnaire et la réponse des cellules à la lectine de Dolichos.

La capacité de croissance cellulaire s'exprime au niveau moléculaire par la synthèse de l'ADN. Celle-ci est généralement appréciée par l'incorporation de la thymidine tritiée, précurseur spécifique de l'ADN. En effet, les lymphocytes humains circulants en culture, qui ne se divisent pas, incorporent de faibles quantités de thymidine, tandis que sous l'effet des lectines mitogènes une stimulation considérable de l'incorporation de thymidine tritiée accompagne la division (POWELL et LEON 1970, DOUGLAS 1971). Ces observations largement reproduites avec plusieurs lectines (LING 1968) suggèrent que ces mitogènes aspécifiques modifient le programme de replication de l'ADN dans les lymphocytes normaux (HARDY et LING 1973). Ce programme est-il modifié dans d'autres cellules dont la croissance est influencée par les lectines ? La réponse sera imparfaite, car peu d'études ont été effectuées sur d'autres cellules normales, tumorales, embryonnaires, en primoculture ou en culture continue. Dans le présent travail, les études d'incorporation de la thymidine dans les cellules normales et transformées ont été effectuées par la méthode autoradiographique. L'autoradiographie présente l'avantage de localiser l'incorporation de thymidine au niveau subcellulaire. Il est observé que seul le noyau est marqué. Il reste que cette technique est essentiellement qualitative et que l'expression des résultats en pourcentage de noyaux marqués par rapport au nombre de noyaux totaux reflète la capacité de croissance des cellules, mais pas la quantité de thymidine tritiée incorporée par cellule.
Les lectines stimulent la croissance des cellules hépatiques normales en primoculture et pourtant ces cellules n'incorporent pas la thymidine tritiée. Or la thymidine doit être phosphorylée par la thymidine kinase avant d'être incorporée dans l'ADN. TASPER et BRASEL (1973) ont observé l'incorporation de thymidine triphosphate tritiée, ainsi que des autres bases triphosphates

dans les cellules hépatiques normales de rat ; ils mettent aussi en évidence une activité de l'ADN polymérase dans ces cellules. Il est donc probable que la différence entre les deux résultats est liée à la nature du précurseur, thymidine dans nos expériences et thymidine triphosphate dans l'expérience de TASPER et BRASEL (1973), et que les cellules hépatiques normales ont une faible activité thymidine kinase comme l'avait observé SEED (1965) pour divers types de cellules. Un autre type de cellule cultivée en lignée continue, les BHK 21 ont une incorporation de thymidine tritiée stimulée sous l'influence des lectines mitogènes. Cependant, il existe des différences considérables dans l'incorporation de thymidine tritiée dans les lymphocytes normaux et les cellules BHK 21/C13 en présence de lectines. Cette incorporation se produit au maximum après 24 heures de culture, avec un facteur de multiplication de 3 dans ces dernières cellules, tandis que le maximum d'incorporation est atteint après 72 heures de culture et multiplié par 1000 dans les lymphocytes. Il est probable qu'une cause de cette différence réside dans l'état biologique différent de ces cellules ; les lymphocytes sont des cellules quiescentes qui n'incorporent pratiquement pas de thymidine, tandis que les cellules BHK 21/C13 se multiplient activement et incorporent de la thymidine même en l'absence de lectines.

Les lectines qui ralentissent la croissance des cellules tumorales, agissent-elles parallèlement sur la synthèse de l'ADN dans ces cellules ? CASO (1966) mesure directement la quantité d'ADN, et DENT (1971) l'incorporation de thymidine tritiée respectivement dans les cellules Hela et les cellules de lymphone murin. Ils observent une diminution de la synthèse de l'ADN dans ces deux types de cellules tumorales. Des résultats semblables ont été observés dans nos études sur l'incorporation de thymidine tritiée en présence de lectine dans les cellules hépatiques tumorales de rat et dans les cellules BHK 21/Py. L'effet des lectines est plus intense sur les cellules tumorales de rat que sur les cellules BHK 21/Py ; cette différence quantitative pourrait refléter la différence de capacité de croissance intrinsèque ainsi que le pouvoir de tumorisation de ces cellules. Ces deux propriétés sont en effet plus importantes dans les cellules tumorales de rat que dans les cellules BHK 21/Py.

Les lectines modifient l'incorporation de thymidine tritiée dans les fibroblastes d'embryon de poulet selon l'âge de l'embryon, en relation avec

les effets des lectines sur la croissance de ces cellules en culture. En effet l'incorporation est stimulée dans les fibroblastes de 16-20 jours, mais elle est diminuée dans les fibroblastes au 8e-10e jour. Des résultats identiques ont été obtenus sur ces mêmes cellules en déterminant l'incorporation de thymidine tritiée non plus par autoradiographie, mais en scintillation liquide (ROGUET et BOURRILLON 1975). Avec un système cellulaire différent prélevé sur des embryons de poulet d'âges variés, KAPLOWITZ et MOSCONA (1973) obtiennent des résultats semblables, bien que présentant quelques différences. En effet l'incorporation maximum de thymidine tritiée dans les cellules de la rétine neurale sous l'effet des lectines débute au 9e jour, est maximum au 12e jour du développement et pratiquement nulle au 13e jour. La diminution de l'incorporation de lectine est beaucoup plus précoce (6e-7e jour) dans les cellules de la rétine neurale que dans les fibroblastes (8-10 jours).
Il existerait donc une relation entre l'état de différenciation des cellules et leur capacité de prolifération. Les cellules de rétine neurale, plus tôt différenciées que les fibroblastes se multiplient seulement jusqu'au 8e jour du développement.

Le mécanisme par lequel les cellules mitogènes modifient la croissance cellulaire est encore peu connu. Il apparaît complexe et n'est probablement pas univoque. Cependant il a été largement démontré que les effets des lectines sur les cellules impliquent obligatoirement leur liaison préalable avec des récepteurs de nature glucidique présents à la surface des cellules. Ainsi la stimulation de la croissance et la transformation des lymphocytes normaux et l'agglutination des cellules tumorales sous l'effet de certaines lectines sont inhibées plus ou moins spécifiquement par des monosaccharides ou des glycoconjugués qui semblent être les déterminants de l'interaction entre les lectines et les cellules (LIS et SHARON 1972 ; BOURRILLON 1973,1975 ; NICOLSON 1974). Ces composés glucidiques peuvent en outre dissocier la liaison lectine-cellule. Il y a donc inhibition compétitive envers les lectines entre les surfaces cellulaires et des glycoconjugués convenables. L'interaction entre les lectines et les cellules est aussi une étape obligatoire de l'effet des lectines sur la prolifération des cellules normales, tumorales et embryonnaires. En effet par des méthodes immunologiques et immunochimiques, il est possible de bloquer les effets des lectines sur la

croissance cellulaire. La lectine préalablement incubée avec le sérum anti-lectine monospécifique perd son activité sur la croissance des cellules étudiées quelque soit le type de cellule et son état physiologique. Cet effet inhibiteur est spécifique, car un sérum anti lectine hétérologue est sans effet inhibiteur et le degré d'inhibition de l'antisérum est fonction du rapport lectine-sérum anti lectine. Parallèlement, par la technique immunochimique de l'inhibition hapténique, il a été montré que des monosaccharides et des glycoconjugués inhibent l'effet des lectines sur la croissance des cellules avec la même spécificité que dans le cas de l'agglutinabilité. Ainsi l'α methyl mannoside inhibe les effets de la Concanavaline A, mais aucun monosaccharide n'est inhibiteur des effets de la lectine de Robinia à la fois sur la croissance et l'agglutinabilité cellulaires.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'action différentielle des lectines sur les cellules normales et transformées. La première hypothèse fut formulée par BURGER (1968) et par INBAR et SACHS (1969). Ces auteurs admettaient que les cellules transformées fixent plus de molécules de lectine sur la surface cellulaire que les cellules normales, dans lesquelles les sites récepteurs de lectine seraient sous forme "cryptique". La protéolyse limitée des cellules normales leur ferait perdre l'inhibition de croissance par contact cellulaire et les rendraient accessibles aux lectines ; les cellules normales protéolysées deviendraient alors agglutinables comme les cellules transformées. Ainsi, selon ces auteurs la transformation virale ou par les carcinogènes des cellules, comme la protéolyse, peut être par le même mécanisme (SCHNEBLI 1972) démasquerait de nouveaux sites récepteurs dont le nombre serait alors augmenté. Cette hypothèse ne semble pas exacte car les cellules normales contiennent des nombres semblables de sites récepteurs de lectines. CLINE et LIVINGSTONE (1971) trouvent que la quantité de lectine tritiée fixée par les cellules non transformées n'est pas différente de celle fixée par les cellules transformées. Avec la Concanavaline A et la lectine du germe de blé marquées à ^{131}I, OZANNE et SAMBROOK (1971) observent que les cellules normales 3T3 et BHK et leurs homologues transformées 3T3 SV et BHK/Py fixent la même quantité de lectines, bien que les cellules transformées soient plus facilement agglutinées par les lectines.

ARNDT-JOVIN et BERG (1971) ; SELA et al (1971) font des observations semblables. Les cellules hépatiques de rat, normales et tumorales fixent la même quantité de Concanavaline A et de lectine de Robinia, bien que la prolifération de ces cellules soit modifiée de façon opposée par les lectines selon leur état physiologique. (DIEVARD et BOURRILLON 1974).

Les actions différentielles des lectines sur les cellules embryonnaires en fonction de l'âge de l'embryon ont aussi été interprétées en relation avec le nombre ou la qualité des sites récepteurs de surface. Une nouvelle membrane serait synthétisée au cours du développement avec des modifications dans le nombre de récepteurs de lectines présents à la surface des cellules (KRACH et al 1974) ; le masquage des sites récepteurs de lectines au cours du développement (BURGER 1969 ; KLEINSCHUSTER et MOSCONA 1972), les rendraient moins accessibles pour l'interaction, ce qui semblerait confirmé par l'accessibilité des sites aux lectines après protéolyse limitée des cellules embryonnaires âgées. Donc ces sites ne seraient pas absents mais seulement masqués (MOSCONA 1971), comme cela avait été suggéré pour les cellules adultes normales (BURGER 1969). Cependant aucune étude quantitative de la fixation des lectines sur ces types de cellules embryonnaires n'avait été réalisée. La seule détermination quantitative des sites récepteurs de la lectine à la surface des cellules embryonnaires concerne les fibroblastes d'embryon de poulet à différents stades du développement (ROGUET et BOURRILLON 1975). Les résultats obtenus ne sont pas en faveur d'un masquage des sites qui progresserait au cours du développement embryonnaire. En effet le nombre de sites récepteurs des lectines de Dolichos et de Ricin est constant du 8e au 16e jour du développement, tandis que le nombre des sites de la Concanavaline A et de la lectine de Robinia élevé au stade précoce, est très faible au 12e jour pour remonter au 16e jour. Un masquage des sites au cours de la différenciation serait un phénomène continu et progressif et donc moins prononcé au 12e jour qu'au 16e jour. Il est d'autre part peu vraisemblable que les sites récepteurs de certaines lectines soient démasqués pendant tout le développement, tandis que d'autres le sont seulement au stade précoce, car les sites récepteurs de toutes les lectines sont de nature glycoprotéique.

Des perturbations de l'organisation topographique des sites récepteurs de lectines ont été rendues responsables de l'agglutinabilité différentielle des cellules normales et transformées induite par les lectines. Diverses

méthodes, faisant généralement intervenir la microscopie électronique, ont révélé des différences dans la distribution des sites récepteurs de lectines à la surface des cellules. Une distribution groupée favoriserait l'agglutination des cellules transformées, tandis que la distribution plus uniforme des sites sur les cellules normales réduirait l'agglutinabilité sans affecter la liaison entre les lectines et les cellules (MALUCCI 1971 ; NICOLSON 1971, 1972 ; BRETTON et al. 1972 ; MARTINEZ-PALOMO et al. 1972 ; INBAR et SACHS 1973).

En outre, la trypsinisation rend les cellules normales agglutinables par les lectines, sans augmenter le nombre des sites de liaison (OZANNE et SAMBROOK 1971), mais en provoquant un groupage des sites récepteurs de lectines, comme sur les cellules transformées (NICOLSON 1972).

Il existerait donc une relation directe entre l'agglutinabilité de cellules par les lectines et la distribution des sites récepteurs de lectines à la surface des cellules normales et transformées. Cependant, dans certains cas il n'y a aucune différence dans la distribution des sites (BRETTON et al. 1972 ; MARTINEZ-PALOMO et al. 1972 ; SMITH et REVEL 1972 ; de PETRIS et al. 1973). Inversement des modifications dans la distribution des sites récepteurs, consécutives à la transformation n'étaient pas accompagnées d'une agglutinabilité augmentée des cellules (TORPIER et MONTAGNIER 1973).

En fait il a été observé que la distribution des sites récepteurs de lectines à la surface des cellules n'est pas une propriété inhérente de la cellule, mais est influencée par la lectine elle-même. A 4°C, les cellules transformées montrent une distribution uniforme des sites récepteurs de lectines, comme les cellules normales, mais si la température est élevée à 20°C il se produit un groupage rapide des sites sur les cellules transformées, mais pas sur les cellules normales (COMOGLIO et GUGLIELMONE 1972 ; NICOLSON 1973, ROSENBLITH et al. 1973). De même des fibroblastes transformés, fixés avant la liaison avec la lectine présentent une distribution uniforme des sites récepteurs (de PETRIS et al. 1973 ; INBAR et al. 1973 ; ROSENBLITH et al. 1973).

Ces résultats indiquent que les différences dans la surface cellulaire entre les cellules normales et les cellules transformées reflètent des différences dans la mobilité des sites récepteurs plutôt que dans leur distribution initiale. Cette interprétation est en outre en accord avec le

modèle mosaïque de la membrane cellulaire "Fluid Mosaïc Model" de SINGER et NICOLSON (1972), qui montre la membrane consistant de protéines et de glycoprotéines flottant dans une matrice lipidique.

En fait le groupage des sites récepteurs de lectines, sous l'influence des lectines, joue une rôle important dans l'agglutinabilité des cellules à faibles concentrations de lectines, mais pour des concentrations élevées les différences dans l'agglutinabilité disparaissent. Il est probable que l'augmentation des densités locales des sites de liaison provoquée par le groupage favorise l'agglutinabilité en multipliant les possibilités d'interaction entre cellules adjacentes ; à concentration élevée de lectine, la densité moyenne des sites occupés par les lectines est suffisante pour provoquer l'agglutination des cellules sans le groupage des sites à la surface des cellules (NICOLSON 1971, 1972).

La relative mobilité des sites récepteurs de lectines à la surface des cellules transformées est encore difficile à expliquer. La transformation cellulaire pourrait altérer la fluidité de la couche lipidique. Il a aussi été suggéré que le mouvement des récepteurs de surface est sous le contrôle des structures cytoplasmiques attachées à la surface interne de la membrane (BERLIN et UKENA 1972 ; de PETRIS et RAFF 1972 ; YIN et al 1972, EDELMAN et al 1973 ; YAMARA et EDELMAN 1973 a,b). Ces structures sont identiques ou reliées au système des microfilaments et des microtubules. La densité des sites peut être insuffisante pour entraîner l'agglutinabilité des cellules par les lectines, sauf si une aggrégation interne des récepteurs de lectines se produit par action des composants contractiles associés aux membranes. Des perturbations transmembrannaires ont été observées, soit provenant de la surface externe et modifiant la surface de la membrane interne (JI et NICOLSON 1973), soit au niveau de la surface interne et transmise aux composants de la surface externe (NICOLSON et PAINTER 1973).

Quant au rôle de la mobilité et de la distribution des sites récepteurs de lectines dans l'effet différentiel des lectines sur la croissance des cellules selon leur état de différenciation, il est pour l'instant difficile de trouver une explication.

Une autre hypothèse fait intervenir des modifications chimiques des sites récepteurs de lectines. Il a été proposé (WALLACH 1968 ; BURGER 1971, PARDEE 1971 ; EMMELOT 1973) que les différences entre les propriétés

biologiques des cellules normales et transformées provenaient d'altérations structurales et (ou) topologiques des macromolécules localisées à la surface des membranes plasmiques. La surface cellulaire est couverte d'un revêtement de glycoprotéines. Au cours de la transformation et de la différenciation cellulaire, ils se produisent des modifications sur les chaînes oligosaccharidiques de ces macromolécules.

Les altérations des glycoprotéines des surfaces cellulaires ont été révélées et étudiées par des méthodes immunologiques et biochimiques. L'immunologie démontre que la transformation néoplasique est accompagnée de l'apparition d'antigènes de surface cellulaire qui sont l'expression altérée des glycoprotéines des membranes plasmiques. Les modifications biochimiques des surfaces cellulaires ont été étudiées directement par l'analyse chimique des constituants glucidiques et l'analyse des enzymes du métabolisme des glycoprotéines. Des divergences importantes, voire des résultats contradictoires, ont été observés selon les types de cellules (BOURRILLON 1973, 1975 ; NICOLSON 1974 ; SHARON et LIS 1974).

Un nombre très restreint de travaux ont été effectués sur les glycoprotéines isolées des membranes de surfaces. BUCK et al (1971) ; WARREN et al (1973) révèlent la présence d'une activité sialyl transférase spécifique augmentée dans les cellules BHK 21 transformées, qui serait responsable de la présence de glycoprotéines de poids moléculaire élevé sur ces cellules. La formation de ces glycoprotéines lourdes paraît dépendante de la croissance, car elles sont présentes en quantités élevées, non seulement dans les cellules transformées, mais aussi dans les cellules normales à croissance rapide, alors qu'elles sont très réduites dans les cellules en phase stationnaire, même dans les cellules transformées (GLICK et BUCK 1973).

Une glycoprotéine a été isolée des cellules tumorales TA-3St de l'adéno-carcinome mammaire de souris qui masque les antigènes d'histocompatibilité. Le masquage par une glycoprotéine des antigènes associés aux tumeurs, pourrait contribuer à l'immunogénicité diminuée des cellules tumorales.

L'étude des surfaces cellulaires à l'aide des lectines constitue une stratégie récente. Certaines lectines sont capables de révéler des différences entre les cellules normales et les cellules transformées. On sait que les effets des lectines sur les cellules s'exercent après l'interaction entre les lectines et des sites récepteurs glucidiques situés à la surface des cellules.

Or cette interaction est empêchée par des monosaccharides ou des glycoconjugués structurellement reliés aux sites récepteurs.

Puisque les lectines interagissent avec des résidus saccharidiques, les effets modifiés des lectines sur les cellules après la transformation cellulaire impliquent très probablement des altérations structurales des oligosaccharides des surfaces cellulaires. Ces modifications sont généralement explorées par la technique d'inhibition compétitive des effets des lectines sur les cellules, au moyen de monosaccharides et de glucoconjugués de structure connue. Avec des lectines de spécificités glucidiques variées, les modifications saccharidiques induites par la transformation maligne ou embryonnaire, pourraient être précisées. En comparant les effets de divers glycoconjugués sur la prolifération des cellules hépatiques de rat, normales et tumorales, nous avons observé une inhibition sélective selon l'état de différenciation des cellules. Ainsi, le dilactominyl lacto N-tétraose inhibe l'effet de la lectine de Robinia sur la croissance des cellules normales, mais il est sans effet sur les cellules d'hépatome. C'est l'inverse avec un fuco-oligosaccharide à activité de groupe sanguin O(H).

Ces résultats suggèrent que les sites récepteurs d'une même lectine peuvent être structurellement différents à la surface des cellules normales et transformées homologues .

Les études structurales, directes et indirectes des macromolécules des surfaces cellulaires révèlent donc des différences selon l'état de différenciation cellulaire, ce qui pourrait expliquer le comportement différent des cellules normales et tumorales en cultures, ainsi que l'effet différentiel des lectines. Cependant, outre que les différences structurales entre cellules normales et transformées sont encore imprécises, parfois contradictoires, en tout cas non univoques, il reste à démontrer qu'il existe une relation directe entre les modifications biochimiques des surfaces cellulaires et le processus malin.

La toxicité des lectines a aussi été invoquée pour expliquer les effets différentiels des lectines sur les cellules et en particulier l'inhibition de la croissance des cellules tumorales. STILLMARK (1888) avait déjà observé que la première erythro-agglutine végétale, isolée des graines de ricin était toxique. D'autres lectines avec des effets toxiques ont par la suite été

isolées (KINGSBURY 1964 ; OLSNES 1972). Ces agglutinines toxiques inhibent la croissance in vivo et in vitro des cellules tumorales (LIN et al 1970). De faibles concentrations de la lectine de Ricin tuent les lymphomes et myelomes murins (RALPH et NAKOINZ 1975) et les fibroblastes transformés (NICOLSON et al 1973) et aussi, mais à des concentrations plus élevées, les cellules normales. En fait ces résultats étaient généralement obtenus avec des doses très élevées de lectines. Ainsi la Concanavaline A, mais pas les lectines du soja et du germe de blé, à la dose de 2-4 mg tue les cellules de lymphome induit par le virus de Moloney (INBAR et al 1972) ; ces doses sont très supérieures à celles nécessaires à la stimulation des lymphocytes et à l'agglutination des érytrocytes (1 à 20 µg). Dans d'autres cas et en particulier avec la lectine de Phaseolus, il faut tenir compte du degré d'homogénéité des lectines. En effet certaines des lectines utilisées sont très hétérogènes et pourraient contenir des impuretés protéiques toxiques. Or nos résultats sur l'inhibition de croissance des cellules tumorales, hépatomes et BHK 21/Py sont obtenus avec des doses faibles de lectines homogènes, 3 à 6 µg, semblables à celles qui stimulent la croissance des cellules normales. Il est peu vraisemblable que des lectines soient toxiques pour des cellules transformées à des doses qui stimulent la croissance et la synthèse de l'ADN dans les cellules normales.

La toxicité sur les cellules des deux lectines utilisées dans ce travail a été explorée par plusieurs méthodes. Les méthodes cytologiques, examen des cellules en contraste de phase et test d'exclusion du trypan bleu, largement utilisées pour apprécier la viabilité cellulaire, ne révèle aucun effet toxique de la Concanavaline A et de la lectine de Robinia. Cette absence de toxicité de la Concanavaline A est en désaccord avec les résultats de plusieurs travaux. Ces contradictions sont peut être liées,soit aux systèmes cellulaires étudiés, soit plutôt aux doses utilisées. La viabilité cellulaire appréciée par le test d'exclusion du bleu trypan, pourrait être conservée sans que les cellules puissent se multiplier.
C'est pourquoi un test de toxicité biochimique fondé sur l'étude de la synthèse de l'ARN ou des protéines cellulaires a été utilisé. Ce test fait intervenir l'incorporation de l'uridine tritiée dans les cellules traitées par les lectines. Les résultats obtenus excluent un effet toxique des lectines utilisées, car l'incorporation n'est pas inhibée.

En outre, les cellules à différents stades de différenciation sont sélectivement sensibles aux lectines, puisque les mêmes doses qui stimulent la prolifération des cellules embryonnaires âgées, inhibent celle des cellules embryonnaires jeunes. La toxicité ne peut être la cause de cette différence, car l'observation directe des cellules, le test d'exclusion au trypan bleu et la synthèse de l'ARN exclut tout effet toxique des lectines sur ces cellules. En outre, les lectines ne modifient pas l'adhésivité des cellules au substrat, excellent test de non toxicité pour les cellules qui croissent en monocouche. Ces résultats sont observés pour des doses de lectines de 1 à 50 µg, tandis qu'à des doses plus élevées, 100 µg, les lectines présentent un certain effet toxique révélé par l'étude de l'incorporation d'uridine tritiée à la fois pour les fibroblastes jeunes et les fibroblastes âgés.

Il apparait donc que l'effet différentiel des lectines sur la croissance des cellules selon leur état de transformation ou de différenciation ne peut pas être expliqué par une action toxique de ces agglutinines, ressentie plus intensément par les cellules les moins différenciées.

L'effet d'une substance exogène sur le métabolisme des cellules implique souvent la pénétration de cette substance dans la cellule, avant qu'elle puisse exercer ses effets. La perméabilité cellulaire est donc un facteur essentiel de la vie de la cellule. Or la transformation cellulaire modifie considérablement la surface cellulaire et par conséquent la perméabilité. Les lectines pourraient modifier différemment la perméabilité des cellules normales et transformées, en favorisant leur propre pénétration ou celle de diverses substances présentes dans le milieu et nécessaires à la croissance cellulaire.

Une action directe des lectines sur la perméabilité de la membrane cellulaire a été postulée par NOWELL (1960) et par POGO (1969). Les lectines pourraient modifier la perméabilité cellulaire par un changement conformationnel d'une protéine membrannaire, peut être au niveau de protéines de transport spécifiques qui permettent à des substances de faible poids moléculaires de traverser la membrane (ROTHSTEIN 1968). PETER et HAUSEN(1971) observent que dans les lymohocytes la stimulation de la pénétration intracellulaire de l'uridine ou du glucose est due à une activation du système de transport membranaire ; LUCAS (1967), HAUSEN et STEIN (1968) proposent une autre explication fondée sur une activation de l'uridine kinase. Dans les

lymphocytes quiescents, le pool des nucléotides phosphorylés est faible et il devient très important après stimulation de ces cellules par les lectines.

Aucun travail n'avait encore été effectué sur la perméabilité d'autres cellules en présence de lectines. Dans les fibroblastes d'embryon de poulet et les cellules hépatiques tumorales, les lectines qui sont fortement mitogènes sur les lymphocytes ne modifient pas la valeur du pool acido soluble, mais provoquent des modifications de l'incorporation de la thymidine dans l'ADN des fibroblastes embryonnaires selon l'âge de l'embryon. Ces résultats suggèrent que le transport de la thymidine n'est pas modifié par les lectines dans ces cellules, à l'inverse de ce qui se produit dans les lymphocytes. Un effet des lectines sur le transport de l'uridine est observé pour certaines cellules, en particulier pour les cellules d'hépatome et pour les fibroblastes jeunes. Les lectines diminuent faiblement (15-30%), mais de façon significative la valeur du pool acido soluble dans ces cellules, tandis qu'elles sont sans effet sur la valeur de ce pool dans les fibroblastes d'embryons plus âgés. Parallèlement à cette diminution du pool acido soluble, une diminution de l'incorporation dans l'ARN est observée. Ce résultat est plus en faveur d'un effet des lectines sur l'uridine kinase que sur la pénétration de la lectine, bien que cette éventualité ne puisse être totalement éliminée.

Ces résultats suggèrent que les lectines ne modifient pas ou trop faiblement la perméabilité cellulaire, pour expliquer leurs effets différentiels sur la croissance des cellules normales et transformées.

Il est possible que la pénétration de la lectine dans la cellule soit nécessaire à son effet sur la prolifération cellulaire et que les différences de perméabilité membrannaire selon l'état physiologique des cellules favorisent ou au contraire contrarient la pénétration intra-cellulaire des lectines. L'éventuel effet intra-cellulaire des lectines est très controversé. Selon certains auteurs, l'effet stimulant est exclusivement un phénomène de surface ; l'entrée de la lectine dans la cellule, subséquente à la liaison (R-AZAVI 1966 ; SMITH et HOLLERS 1970) n'est pas essentielle pour la stimulation mitogénique. En effet, les lectines peuvent être éliminées de la cellule par lavage, sans modifier leurs effets sur la mitose (STEIN et al 1972) et les lectines insolubilisées par leur liaison avec des perles de sépharose, forment un complexe trop large pour pouvoir être capté dans la cellule, conservent la propriété d'activer les lymphocytes (ANDERSON et al 1972, BETEL et VAN.DEN BERG 1972 ; GREAVES et BAMMINGER 1972). Pour d'autres

auteurs, au contraire, la pénétration de la lectine dans la cellule serait nécessaire à son effet sur la mitose (MICHALOVSKI et al 1964 ; CONARD et DEMOISE 1970). Les lectines pénètreraient dans les cellules par endocytose. Avec un autre système cellulaire, les cellules d'ascite de l'hépatome de Zajdela, nous avons observé que la lectine de Robinia rendue fluorescente par couplage avec l'isothiocyanate de fluorescéine se fixait d'abord sur la membrane plasmique, puis après 30 minutes se retrouvait dans le cytoplasme et après 3 heures était uniquement localisée sur la membrane périnucléaire (AUBERY et al 1972). Des résultats semblables étaient obtenus par ROTH (1974) avec des cellules d'hépatome et la Concanavaline A fluorescente ; il observait en outre que la lectine ne pénétrait pas ou pénétrait très lentement dans les hépatocytes normaux. Il parait exister une relation temporelle entre la pénétration des lectines dans les cellules et leurs effets sur la prolifération de ces cellules.

L'observation de CUATRECASAS et TELL (1973) selon laquelle la Concanavaline et la lectine du germe de blé ont des effets semblables à ceux de l'insuline sur le transport de glucose et la lipolyse dans les adipocytes isolés conduit à examiner l'effet des lectines sur le métabolisme de l'AMP cyclique, médiateur des fonctions de l'insuline.

Les lectines inhibent l'activité de l'adénylate cyclase (ANDERSON et al 1973) et affectent donc le taux d'AMP cyclique (SMITH et al 1971). Cet effet de la lectine s'exercerait au niveau de la membrane. Les lectines provoqueraient un changement de confirmation de la membrane, entrainant une modification de l'activité de l'adenylate cyclase, composant intégral de la membrane des cellules de mammifères (SUTHERLAND et al 1962). WILLINGHAM et PASTAN (1975) expliquent l'agglutinabilité préférentielle des cellules transformées par la présence d'un plus grand nombre de microvillosités à la surface des cellules à division active qu'à la surface des cellules quiescentes. L'AMP cyclique contrôle l'apparition de microvillosités ; une concentration élevée d'AMP cyclique diminue l'agglutinabilité en diminuant la formation de microvillosités, tandis que dans les cellules en mitose active les taux d'AMP cyclique sont faibles, de nombreux microvillosités apparaissent sur la surface cellulaire et les cellules deviennent agglutinables par les lectines.

Cette hypothèse intéressante est cependant combattue car il n'est pas vraisemblable que l'agglutinabilité cellulaire, phénomène complexe, puisse

être expliqué par une seule propriété des surfaces cellulaires. D'autre part cette hypothèse n'explique pas l'effet différentiel des lectines sur la prolifération cellulaire. En effet, les cellules transformées ainsi que les cellules normales, dans la phase mitotique du cycle cellulaire ou après stimulation mitogénique, ont de faibles taux d'AMP cyclique (OTTEN et al 1972 ; SHEPPARD 1972). En se fixant sur les récepteurs de la surface cellulaire, les lectines agissent sur l'adénylate cyclase et l'AMP cyclique dont le taux abaissé , comme dans le cas de l'insuline, déclenche une série de réactions biochimiques appelées réactions pléiotypiques. (KRAM et TOMKINS 1973). Les effets ont été largement démontrés dans le cas des lymphocytes et,aussi bien que de façon encore limitée, avec d'autres cellules (MOREAU et BOURRILLON).

Puisque la corrélation entre la prolifération cellulaire et la réaction pléiotypique est positive avec les lymphocytes normaux et négative avec les cellules tumorales, il conviendrait d'envisager le rôle d'un autre site subcellulaire pour expliquer l'effet différentiel des lectines sur la prolifération. Il est intéressant de remarquer que l'insuline présente les mêmes effets que la lectine sur la prolifération des cellules normales et transformées (AUBERY et al, résultats non publiés).

L'effet différentiel des lectines sur la prolifération cellulaire est fonction de l'état de différenciation des cellules. Les lectines pourraient donc exercer leurs effets sur la prolifération au niveau du noyau. Le mécanisme de cette action reste très hypothétique, mais il faut rappeller que les lectines fluorescentes ont été retrouvées à la surface (AUBERY et al 1972) ou dans le noyau (RUBIN et al 1972) selon une relation temporelle avec la prolifération cellulaire qui est fonction de l'état physiologique des cellules. La lectine pénètre lentement dans les lymphocytes qui prolifèrent après 48-72 heures de culture ; elle pénètre rapidement dans les cellules tumorales dont la prolifération est modifiée après 4 heures de culture. Les lectines pourraient agir directement au niveau du noyau en modifiant le programme de réception de l'ADN.

Les résultats des études sur les effets des lectines sur la croissance et l'agglutinabilité des fibroblastes (ce travail) et des cellules de la rétine neurale (KLEINSCHUSTER et MOSCONA 1972) d'embryon de poulet, ainsi

que sur la synthèse de l'ADN dans ces cellules (KAPLOWITZ et MOSCONA 1973 ; ROGUET et BOURRILLON 1975), à différentes étapes du développement embryonnaire, soulignent une fois de plus le parallélisme entre les cellules embryonnaires jeunes et les cellules tumorales. En effet, l'agglutinabilité des cellules embryonnaires jeunes, l'inhibition de croissance et de la synthèse de l'ADN dans ces cellules en présence de lectine peut se comparer à celle observée avec les cellules tumorales.

Cette étroite relation entre les cellules embryonnaires et cancéreuses était déjà suggérée par l'apparition d'antigènes carcino-embryonnaires à la surface des cellules tumorales adultes (ABELEV et al 1963 ; Von KLEIST 1971) et par la présence d'α_1-fetoprotéine dans le sérum ou les tissus au cours de différents types de cancer (GOLD et FREEDMAN 1965).

Ce parallélisme est encore confirmé par les observations sur la réactivité croisée entre cellules embryonnaires et tumorales (ANDERSON et COGGIN 1972) et par la cytotoxicité réciproque des lymphocytes de tumeurs ou de gestation envers les cellules tumorales et foetales (COGGIN et ANDERSON 1972).

Il se produirait donc dans les cellules malignes une réapparition ou une augmentation des antigènes foetaux après transformation (STONEHILL et BENDICH 1970) et l'agglutinabilité par les lectines des cellules néoplasiques serait en relation avec la réapparition des antigènes embryonnaires à la surface de ces cellules.

Les antigènes de différenciation présents à la surface des cellules embryonnaires jeunes (MOSCONA 1962) et qui seraient l'expression phénotypique du développement et de la différenciation (GOLDSCHNEIDER et MOSCONA 1972) disparaissent de la cellule adulte ou subissent des modifications, et sont démasqués par la transformation ou par dérépression de leur synthèse.

La maligne pourrait donc refléter un retour à l'état embryonnaire, tandis que la différenciation normale abolit les caractéristiques embryonnaires.

Ces antigènes embryonnaires associés aux tumeurs seraient une réexpression sélective de certains gênes impliqués dans le développement à son début. La cellule maligne réexprime les gênes embryonnaires et foetaux et l'embryon parait posséder tous les constituants et caractéristiques nécessaires à la malignité. Cette possibilité de réexpression des gênes pourrait être une menace permanente.

L'expression d'antigènes embryonnaires sur la surface des cellules tumorales est probablement le reflet d'un aspect plus général de l'expression des protéines embryonnaires dans la cellule tumorale.

Les modifications les plus importantes accompagnant la transformation des cellules se produisent à la surface cellulaire (WALLACH 1968) et pourraient rendre compte de la plupart des caractéristiques physiologiques et sociales de la cellule néoplasique.

La relation entre antigènes de surface cellulaire et sites récepteurs de lectine est encore peu précise. Ces derniers sembleraient constamment exposés dans les cellules embryonnaires jeunes ou deviendraient masqués par une couche sensible à la trypsine lorsque la maturation progresse (MOSCONA 1971 ; KAPLOWITZ et MOSCONA 1972). Cependant des sites ou liaisons des lectines sont aussi présents à la surface de cellules embryonnaires plus âgées, non agglutinables. Il est possible que selon l'étape de développement, la distribution et la mobilité relative de certains sites de liaison, et peut être de sites antigènes foetaux sur les cellules embryonnaires jeunes soient différentes. L'existence d'antigènes spécifiques d'étape ou de phase durant le développement embryonnaire a été montrée.

La relation entre la cellule cancéreuse et la cellule embryonnaire d'abord révélée par l'observation clinique, puis par les méthodes immunologiques, semble si étroite que METZ (1972) propose une classification des tumeurs basées sur les relations embryologiques. Ces observations et la constante relation entre la teratogénèse et l'oncogénèse suggère de considérer le cancer comme une affection des mécanismes de la différenciation.

RESUME

RESUME

L'INTRODUCTION rappelle les caractéristiques morphologiques et biologiques qui distinguent les cellules normales et transformées, en particulier les différences dans la croissance et l'adhésivité cellulaires, et l'agglutinabilité préférentielle des cellules transformées par les lectines. Cette dernière caractéristique a été retrouvée avec les cellules embryonnaires dont l'agglutinabilité par les lectines est en relation avec l'âge de l'embryon.

Les diverses interprétations tentant d'expliquer les effets des lectines sur les propriétés biologiques des cellules sont résumées. L'effet de ces agglutinines sur la croissance des lymphocytes normaux en cultures a été rappellé, en même temps que l'absence quasi-totale de telles études sur la croissance d'autres cellules.

L'OBJECTIF DES RECHERCHES est ensuite exposé. Ce travail a pour objet d'expliquer les différences entre des cellules qui se distinguent par leur état de différenciation. Ces différences sont explorées en étudiant l'influence des lectines sur la croissance de ces cellules. Parallèlement, l'effet des lectines sur la biosynthèse des acides nucléiques dans ces cellules est suivi par l'incorporation de précurseurs radioactifs.

La première partie du travail est consacrée à la description du MATERIEL et des METHODES. Des lectines de spécificités immunochimiques variées, et des cellules normales, tumorales et embryonnaires sont utilisées dans ces études. La croissance cellulaire est généralement effectuée en primo-culture. L'incorporation dans les cellules des précurseurs radioactifs des acides nucléiques est appréciée, soit en autoradiographie, soit par comptage par scintillation liquide.

Les RESULTATS expérimentaux originaux sont présentés dans une deuxième partie qui comprend trois chapitres.

Le premier chapitre est consacré à l'étude de l'action des lectines sur la croissance cellulaire. Il est observé que deux lectines mitogènes stimulent

la croissance des cellules normales en primo-culture et en lignée continue, ainsi que celle des cellules embryonnaires prélevées dans la dernière phase du développement ; ces mêmes lectines diminuent la croissance des cellules transformées en primo-culture et en lignée continue, ainsi que celle des cellules embryonnaires provenant de jeunes embryons. Il est encore observé qu'une lectine non mitogène, la lectine de Dolichos, est active sur les cellules d'origine embryonnaire, fibroblastes d'embryon de poulet et cellules BHK/21, mais inactive sur la croissance des cellules adultes.

Le deuxième chapitre traite de la spécificité des effets des lectines sur la croissance cellulaire. Ces effets sont inhibés par les sérum anti lectines homologues et par des inhibitions saccharidiques, différents selon la spécificité des lectines. Les résultats obtenus montrent que la liaison des lectines sur des sites récepteurs présents à la surface des cellules est une étape obligatoire de l'effet de ces agglutinines sur la croissance des cellules. Ils confirment en outre que ces sites récepteurs sont de nature saccharidique. Enfin des études d'inhibition comparée de l'effet d'une même lectine sur des cellules homologues, normales ou transformées suggèrent que les sites récepteurs d'une même lectine peuvent être structurellement différents à la surface des cellules normales et transformées homologues.

La troisième partie observe le mécanisme d'action des lectines sur la croissance des cellules. Deux hypothèses sont explorées, la toxicité des lectines et leur effet sur la perméabilité membrannaire. Un effet cytotoxique est exclu d'après les différents tests utilisés pour expliquer l'inhibition de croissance des cellules tumorales et embryonnaires jeunes en présence de lectines. La modification de la perméabilité cellulaire par les lectines ne peut pas être retenue, tout au moins en ce qui concerne la perméabilité aux molécules de faible poids moléculaire.

La DISCUSSION des résultats comprend essentiellement deux parties :

La première partie traite du choix des cellules en discutant les avantages respectifs des cellules en lignée continue et des cellules fraichement prélevées cultivées en primo-culture. L'intérêt du modèle lectines-croissance cellulaire par comparaison au modèle lectine-agglutination cellulaire est en outre souligné.

La deuxième partie tend à expliquer les raisons pour lesquelles les cellules réagissent différemment aux lectines selon leur état de différencia-

tion. Sept hypothèses sont discutées, qui isolément ne peuvent rendre compte de ces effets différentiels des lectines. Il est proposé que les lectines agissent à deux niveaux : d'une part elles se fixeraient sur la membrane plasmique et déclencheraient par un mécanisme encore imprécis une série de modifications biochimiques intra-cellulaires, et d'autre part, après avoir pénétré dans la cellule, elles exerceraient un effet au niveau du noyau en relation avec leur action sur la prolifération cellulaire.

L'existence d'étroite relation entre la cellule cancéreuse et la cellule embryonnaire est proposée.

Une BIBLIOGRAPHIE complète ce travail.

I PUBLICATIONS

- Action de deux phytohemagglutinines sur la croissance des cellules normales et tumorales
  M. AUBERY, J. FONT et R. BOURRILLON.Exp. Cell. Res. 71 (1972) 59-64.

- Action de la PHA-R et de la Concanavaline A sur les cellules embryonnaires au cours de l'embryogénèse.
  M. AUBERY et R. BOURRILLON. C.R. Acad. Sci. Paris Série D 276 (1973) 3187-3190.

- Changes in chick embryonic cell growth induced by a specific lectin Dolichos biflorus
  M. AUBERY et R. BOURRILLON. Int. Rev. Commun. System (1973) 73-9 1-2-7.

- Interaction de la lectine de Robinia pseudoacacia et de la Concanavaline A avec les surfaces membrannaires des hépatocytes normaux et tumoraux de rat.
  M. AUBERY et R. BOURRILLON.Immunochem. 11 (1974) 565-572.

- Cell growth and thymidine incorporation changes induced by Dolichos lectin in embryo fibroblasts at various stages of differenciation
  M. AUBERY et R. BOURRILLON. Cell Differentiation 4 (1975) 67-77.

- Stimulation of the proliferation of normal BHK 21 cultured fibroblasts by plant lectins.
  M. AUBERY, R. BOURRILLON, C.H. O'NEILL. Exp. Cell. Res 93 (1975) 47-54.

- Embryo cell surfaces lectin-binding and cell proliferation.
  R. ROGUET, M. AUBERY, R. BOURRILLON. Differentiation sous presse, acceptée n° SP19

- The action of lectins on growth of avian embryonic cells at different stages of cell differentiation
  M. AUBERY, R. BOURRILLON.
  Cell differentiation 5 (1976) 27-35.

II COMMUNICATIONS

- European tissue culture society 23th Annual meeting (1975) Heidelberg "Changes of cell growth in tumor and embryo cell cultures induced by lectins". M. AUBERY

- Second International Conference on Differenciation (1975) Copenhague. "Cell growth and thymidine incorporation changes induced by lectins in embryo fibroblasts at various stages of differenciation".
  M. AUBERY, R. BOURRILLON

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

ABELEV G.D., PEROVA S.D., KRAMKOVA N.J., POSTNIKOVA Z.A., IRLIN I.S. (1963). Production of embryonal serum α-globulin by the transplantable mouse hepatomas. Transplantation. 1. 174.

ABERCROMBIE M., AMBROSE E.J. (1962) The surface properties of Cancer cells : a Review. Cancer Res. 22. 525-548.

ABERCROMBIE M. (1967). Constant Inhibition : The Phenomenon and its Biological Implications. Natl. Cancer Inst. Monogr. 26. 249-273.

AGRELL I.P.S. (1966) The mitogenic action of phosphate and phytohaemagglutinin on free living amoebae. Exp. Cell Res. 43. 591-694.

AMBROSE E.J., JAMES A.M., LOWICK J.H.B. (1956). Differences between the electrical charge carried by normal and homologeous tumour cells. Nature. 177. 576-577.

ANDERSON N.G., COGGIN J.H. (1972) in Embryonic and Fetal Antigens in Cancer. (N.G. Anderson et. J.H. Coggin Jr., eds). vol. 2. US. Dep. Commerce Springfield. Virginia.

ANDERSON J., EDELMAN G.M., MOLLER G., SJOBERG O. (1972). Activation of B lymphocytes by locally concentred Concanavalin A. Europ. J. Immunol. 2. 233-235.

ANDERSON W.B., JOHNSON G.S., PASTAM I. (1973). Transformation of Chick-Embryo Fibroblasts by Wild. Type and Temperature-Sensitive Rous Sarcoma Virus alters adenylate Cyclase Activity. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 70. 1055-1059.

ANTEUNIS A. (1974). Cytochemical and Ultrastructural studies concerning the cell coat glycoproteins in normal and transformed human blood lymphocytes. Exp. Cell Res. 84. 31-39.

ARNDT-JOVIN D.J., BERG P. (1971). Quantitative binding of ^{125}I-Concanavalin A to Normal and Transformed cells. J. Virol. 8. 716-721.

AUB J.C., TIESLAU C., LANKESTER A. (1963). Reactions of normal and tumor cells surfaces to enzymes I - Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 50. 613-619.

AUB J.C., SANFORD B.H., COTE M.N. (1965_{aa}). Studies reactivity of tumor and normal cells to wheat germ agglutinin. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 54. 396-399.

AUB J.C., SANFORD B.H., WANG L.H. (1965_{b}). Reactions of normal and leukemic cell surfaces to a wheat germ agglutinin. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 54. 400-402.

AUBERY M., BOURRILLON R. (1976). Growth Response to lectins in chick embryo cells at different stages of development, Cell Differentiation. 5 (1976) 27-35.

AUBERY M., FONT J., BOURRILLON R. (1972) Action des phytohémagglutinines sur la croissance des cellules normales et tumorales. Exp. Cell Res. 71. 59-64.

BANG F.B. (1956). Effects of Invading organisms on cells and tissues in culture. In Cells and Tissues in culture, Methods, Biology and Physiology, p.162-261, vol. 3. (ed. E.M. Willmer).

BECKER F.F. (1974). Differential lectin Agglutination of Fetal Dividing - Postanal and Malignant Hepatocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 71. 4307-4311.

BERG J.V.D., BETEL L. (1971). Early increase of amino acids transport in stimulated lymphocytes. Exp. Cell Res. 66. 257-259.

BERLIN R.D., UKENA T.E. (1972). Effect of colchicine and vinblastine on the agglutination of polymorphonuclear leucocytes by Concanavalin A. Nature New Biol. 238. 120-124.

BERNHARD W., AVRAMEAS S. (1971) Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of Concanavalin A. Exp. Cell. Res. 64, 232-236.

BETEL I., Van der BERG K.J. (1972). Interaction of Concanavalin with rat lymphocytes. Eur. J. Biochem. 30. 571-578.

BIRD G.W.G. (1959). Hemagglutinins in seeds. Brit. Med. Bull. 15. 165-168.

BORBERG H., YESNER L., GESNER R., SILBER R. (1968). The effect of N-acétyl D-galactosamine and other sugars on the mitogenic avtivity and attachement of PHA on tonsil cells. Blood 31. 747-758.

BORSOS T., DOURMASKIN R.R., HYMPHREY J.H. (1964). Lesions in erythrocytes membranes caused by immune haemolysis. Nature 202. 251-254.

BOURRILLON R. (1973). Interaction des Phytohémagglutinines avec les sites récepteurs des Membranes de Surface des Cellules normales et transformées. Exposés Ann . Biochim. Med. 32ème série (Masson, eds, Paris) p. 59-91.

BOURRILLON R. (1975). Interactions des lectines avec les membranes de surface des cellules normales et tumorales. Biol. Med. 4. 31-52.

BOURRILLON R., FONT J. (1968). Purification et propriétés physicochimiques d'une phytohémagglutinine de Robinia pseudoacacia. Isolement d'un glycopeptide actif. Biochim. Biophys. Acta 154. 28-39.

BOURRILLON R., GOUSSAULT Y. (1968). Isolement à partir de l'urine humaine normale d'un fuco hétéropolysaccharide à activité de groupe sanguin O(H).Carbohydrate Res. 8. 175-184.

BOYD W.C. (1963). The lectins : their Present status. Vox Sang. 8. 1-32.

BRETTON R., WICKER R., BERNHARD W. (1972). Ultrastructural localization of Concanavalin A receptors on normal and SV-40- transformed hamster and rat cells. Int. J. Cancer. 10. 397-410.

BUCK C.A., GLICK M.C., WARREN L. (1971). Effect of growth on the Glycoprotein from the Surface of Control and Rous Sarcoma Virus Transformed Hamster Cells. Biochem. 10. 2176-2180.

BUFFE D., RIMBANT C., BURTIN P. (1971). Etude par la Concanavalin A fluorescente des sites glucidiques des membranes de cellules foetales humaines : rapport avec la différenciation cellulaire. C.R. Acad. Sci. 273. 1391-1393.

BURGER M.M. (1968). Isolation of a receptor Complex for a tumour Specific Agglutinin from the Neoplastic Cell Surface. Nature 219. 499-500.

BURGER M.M. (1969). A difference in the architecture of the Surface Membrane of normal and virally transformed Cells. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 62. 994-1001.

BURGER M.M. (1971). Cell Surfaces in neoplastic transformation. In current topics in cellular regulation. Vol 3. 135-193. Academic Press Inc. New York and London.

BURGER M.M. (1973). Surface changes in transformed Cells detected by lectins. Fed. Proc. 32. 91-101.

BURGER M.M., GOLDBERG A.R. (1967). Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 57. 359-362.

BURGER M.M., NOONAN K.D. (1970). Restoration of normal growth by covering of agglutinin. Sites on tumour cell surfaces. Nature 226. 512-515.

CAHN R.D., CAHN M.B. (1966). Heritability of cellular differentiation : clonal growth and expression of differentiation in retinal pigment cells in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 55. 106-114.

CASO L.V. (1968). The effects of Phytohemagglutinin on the growth and Histochemical of Mammalian cells in tissue culture. Anat. Rec. 162. 459-466.

CECCARINI C. (1971) Induction and Reversal content inhibition of growth by pH modification. Nature New Biol. 233. 271-273.

CECCARINI C., EAGLE H. (1971). pH as a determinant of Cellular growth and content inhibition. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 68. 229-233.

CLINE M.J., LIVINGSTONE D.C. (1971). Binding of ^{3}H Concanavalin A by normal and transformed cells. Nature New Biol. 232. 155-157.

CODINGTON J.F., SANFORD B.H., JEANLOZ R.W. (1973). Cell-Surface Glycoproteins of two sublines of the TA3 Tumor. J. Nat. Cancer Inst. 51. 585-591.

COGGIN J.H., ANDERSON N.G. (1974). Cancer, Differentiation and embryonic Antigens, some Central Problems. Adv. Cancer Res. 19. 105-165.

COLLINS M.F. (1974). The Role of the Cell Surface in Embryonic Morphogenesis. In (B.V. Sherbet ed.) Neplasia and Cell Differentiation 234-278.

COMOGLIO P.M., GUGLIELMONE R. (1972). Two dimensional distribution of Concanavalin A receptor molecules on fibroblast and lymphocyte plasma membranes. FEBS letters. 27. 256-258.

COOK G.M.W., HEARD D.H., SEAMAN G.V.F. (1961). Sialic acids and the electrokinetic charge of the human erythrocyte. Nature. 191. 44-47.

COOPER H.L. (1969). Ribosomal ribonucleic acid production and growth regulation in human lymphocytes. J. Biol. Chem. 244 1946-1952.

COOPER H.L. (1971). Biochemical alterations accompanying initiation of growth in resting cells. In the Cell Cycle and Cancer (R, Baserga, ed.), Dekker-New York.

COOPER E.H., BARKHAN P., HALE A.J. (1963). Observations on the proliferation of human leucocytes cultured with Phytohemagglutinin. Brit. J. Haemat. 9. 101-111.

COOPER H.L., RUBIN A.D. (1965). RNA metabolism in lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. Initial responses to phytohemagglutinin. Blood. 35. 44-55.

CONARD R.A. et DEMOISE C.F. (1970). Preparation and Purification of Tritated Phytohemagglutinin and Studies of Cellular Localization in human Leucocytes cultures. Blood. 35. 44-55.

CORMACK D. (1970). Effect of Enzymatic Removal of cell Surface Sialic Acid on the Adherence of Walker 256. Tumor cells to Mesothelial Membrane. Cancer Res. 30. 1459-1466.

CORNIC M. (1975). Modification age-dependant de l'agrégation spontanée des cellule embryonnaires sous l'action des Lectines. Diplôme d'Etudes Approfondies de Physiologie Cellulaire (Paris VI).

CUATRACASAS P., TELL G.P.E. (1973). Insulin-like Activity of Concanavalin A and Wheat germ Agglutinin. Direct Interactions with Insulin Receptors. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 70. 485-489.

CURRIE G.A., BAGSHAWE K.D. (1968_a). The effect of Neuraminidase on the Immunogenicity of the Landschütz Ascite Tumor, Site and Mode of Action. Brit. J. Cancer. 22. 588-594.

CURRIE G.A., BAGSHAWE K.D. (1968_b). The Role of Sialic Acid in Antigenic Expression Further Studies of the Landschütz Ascite Tumor. Brit. J. Cancer. 22. 843-853.

CURTIS A.S.C. (1967). The Cell Surface. Its Molecular Role in Morphogenesis. London; Logo Press, Acad. Press.

DENT P.B. (1971). Inhibition by Phytohemagglutinin of DNA synthesis in cultured Mouse Lymphomas. J. Nat. Cancer Inst. 46. 763-773.

DE PETRIS S., RAFF M.C. (1972). Distribution of immunoglobin on the surface of mouse lymphoid cells as determined by immunoferritin electron microscopy. Antibody-induced, temperature-dependent redistribution and its implications for membrane structure. Europ. J. Immunol. 2. 523-535.

DE PETRIS S., RAFF M.C., MALLUCCI L. (1973). Ligand-induced redistribution of Concanavalin A receptors on normal, tryptinized and transformed fibroblasts. Nature New Biol. 244. 275-278.

DEVILLERS Ch. (1955). Activité cellulaire et morphogénèse. in Exposés Annuels de B Biologie Cellulaire, sous la Direction de J.A. THOMAS. (ed. Masson et Cie) p. 139-166.

DIEVART J.C., BOURRILLON R. (1974). Séparation et purification des sites récepteurs de la lectine de Robinia et de la Concanavaline A, présents à la surface des cellules hépatiques normales et tumorales (hépatome de ZAJDELA) Biochim. Biophys. Acta 345. 198-212.

DODEUR M. Communication personnelle.

DOUGLAS S.D. (1971). Human lymphocyte growth in vitro : morphologic, biochemical, and immunologic significance. Int. Rev. Exp. Pathol. 10. 41-114.

DOWNING H.J., KEMP G.C.M., DENBOROUGH M.A. (1968). Plant Agglutinin and Mitosis. Nature 217. 654-655.

DULBECCO R., STOKER M.C.R. (1970). Conditions Determining Initiation of DNA synthesis in 3T3 cells. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 66. 204-210.

DULBECCO R. (1971). Growth Control in cell cultures. in (G.E.W. Wolstenholme J. Knight eds). A Ciba Foundation symp. Churchill Livingstone, Edinburg and London p. 71-87.

EAGLE H. (1955). Nutrition needs of Mammalian Cells in tissue cultures. Science 122. 501.

EARLE W.R. (1943). The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. Nat. Cancer Inst. 4. 167.

EASTON J.M., GOLDBERG B., GREEN H. (1962_a). Demonstration of surface antigens and pinocytosis in mammalian cells with ferritin antibodies conjugates. J. Cell Biol. 12. 437-449.

EASTON J.M., GOLDBERG B., GREEN H. (1962_b). Immune cytolysis : electron microscopic localization of cellular antigens with ferritin antibodies conjugates. J. Exp. Med. 115. 275-284.

EASTY G.C. (1974). Cell surfaces in Neoplasia. in (B.V. Sherbet ed.) Neoplasia and Cell Differentiation. p. 189-233.

EBERT J.D. (1959). The acquisition of Biological Specificity. in the Cell, Biochemistry, Physiology, Morphologie. p. 619-693, vol 1. (eds. J. Brachet et A.E. Mirsky, Acad. Press 6 volumes).

EDELMAN G.M., YAHARA L., WANG J.L. (1973). Receptor Mobility and Receptor-Cytoplasmic. Interactions in lymphocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 70. 1442 - 1446.

EMMELOT P. (1973). Biochemical properties of Normal and Neoplastic cell surfaces : a review. Europ. J. Cancer. 9. 319-333.

ENTLICHER G., TICHA M., KOSTIR J.V., KOCOUREK J. (1969). Studies on Phytohemagglutinins. II. Phytohemagglutinins of Pisum sativum L. and Lens esculenta. Moench. Specific Interactions with carbohydrates. Experientia. 25. 17-19.

ETZLER M.E., KABAT E.A. (1970). Purification and characterization of a lectin. (Plant Hemagglutinin) with blood group A specificity from Dolichos biflorus. Biochem. 9. 869-877.

EYLAR E.H., MADOFF M.A., BRODY O.V., ONCLEY J.L. (1962). The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. J. Biol. Chem. 237. 1992-2000.

FLICKINGER R.A. (1962).Embryological development of antigens. Adv. Immunol. 2. 309-366.

FONT J., BOURRILLON R. (1971_a). Les constituants glucidiques de la phytohémagglutinine de Robinia pseudoacacia et leur rôle dans l'activité érythroagglutinante. Biochim. Biophys. Acta 243. 111-116.

FONT J., LESENEY A.M., BOURRILLON R. (1971_b). Isolement et propriétés d'une phytohémagglutinine anti A1 extraite de Dolichos biflorus. Biochim. Biophys. Acta 243. 443-446.

FORRESTER J.A., DUMONDE D.C., AMBROSE E.J. (1965). The effect of antibodies on cells II changes in the electrophoretic mobility of ascite tumours cells treated with antibodies and complement. Immunology 8. 37-42.

FOSTER D.O., PARDEE A.B. (1969). Transport of amino acids by confluent and non confluent 3T3 and polyoma virus transformed 3T3 cells growing on glass cover slips. J. Biol. Chem. 244. 2675-2681.

GASIC G., GASIC T. (1962). Removal and regeneration of cell coating in tumour cells. Nature 196. 170-171.

GLICK M.C., BUCK C.A. (1973). Glycoproteins from the surface of metaphase cells. Biochem. 12. 85-90.

GLINOS A.D., WERRLEIN R.J. (1972). Density dependent regulation of growth in suspension cultures of L-929 cells. J. Cell. Physiol. 79. 79.

GOLD Ph., FREEDMAN S.O. (1965). Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and adsorption techniques. J. Exp. Med. 121. 439

GOLD P., GOLD M., FREEDMAN S.O. (1968). Cellular location of carcinoembryonic antigens of the human digestive system. Cancer Res. 28. 1331-1334.

GOLDSTEIN I.J., HOLLEMAN C.E., SMITH E.E. (1965). Protein-carbohydrate Interaction II Inhibition studies on the Interaction of Concanavalin A with Polysaccharides. Biochem. 4. 876-883.

GOLDSCHNEIDER L., MOSCONA A.A. (1972). Tissue-specific cell surface antigens in embryonic cells. J. Cell Biol. 53. 435-449.

GREAVES M.F., BAUMINGER S. (1972). Activation of T and B lymphocytes by insoluble phytomitogens. Nature New Biol. 235. 67-70.

GREEN H., BARROCO P., GOLDBERG B. (1959). Effect of antibody and complement on permeability control in ascite tumour cells and erythrocytes. J. Exp. Med. 110. 690-713.

GRIMMONPREZ L., BOUQUELET S., BAYARD B., SPIK G., MONSIGNY M., MONTREUIL J. (1970). Détermination de la structure d'un hexaose isolé du lait de femme, le dilactaminyl-lacto-N-tétraose. Eur. J. Biochem. 13/ 484-492.

HAKOMORI S. (1970). Cell-Density - Dependent changes of Glycolipid concentrations in Fibroblasts, and loss of this Response in virus - transformed cells. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 67. 1741-1747.

HAKOMORI S. (1975). Structures and Organization of cell surface glycolipids Dependency on cell growth and Malignant Transformation. Biochem. Biophys. Acta. 417. 55-89.

HAKOMORI S., MURAKAMI W.T. (1968). Glycolipids of Hamster Fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 59. 254-261.

HARDY D.A., LING N.R. (1973). The mitotic activation of lymphocytes. Biochemical and immunological consequences. in the cell cycle in development and differentiation (Balls M. et Billet S., eds) vol 1 p. 397-436.

HAUSEN P., STEIN M. (1968). On the synthesis of RNA in lymphocytes stimulated by Phytohemagglutinin. 1- Induction of uridine-kinase and the conversion of uridine to UTP. Europ. J. Biochem. 4. 401-406.

HEIDRICK M.L., RYAN W.L. (1971). Adenosine 3', 5' cyclic monophosphate and Contact inhibition. Cancer Res; 31. 1313-1315.

HOLLEMAN J.W., PALMER W.G. (1972). in Embryonic and Fetal Antigens in Cancer. (N.G. Anderson et J.H. Coggin Jr, eds). vol 2. p. 117. US. Dep. Commerce Springfield, Virginia.

HUNGERFORD D.A., DONNELY A.J., NOWELL P.C., BECK S. (1959). The chromosome constitution of a human. Am. . J. Human Genet. 11. 215-236.

HYNES P.O. (1974). Role of Surface. Alteration in cell transformation the importance of proteases and surface proteins. Cell. 1. 147-156.

INBAR M., SACHS L. (1969_a). Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells. Nature 223. 710-712.

INBAR M., SACHS L. (1969_b). Interaction of carbohydrate binding protein Concanavalin A with normal and transformed cells. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 63. 1418-1425.

INBAR M., SACHS L. (1973). Mobility of carbohydrate containing sites on the surface membrane in relation to the control of cell growth. FEBS letters 32. 124-128.

INBAR M., BEN-BASSAT H., SACHS L. (1972). Inhibition of ascite tumor development by Concanavalin A. Int. J. Cancer 9. 143-149.

INBAR M., BEN-BASSAT H., SACHS L. (1973_a). Temperature- sensitive activity on the surface membrane in the activation of lymphocyte by lectins. Exp. Cell Res. 76. 143-151.

INBAR M., BEN-BASSAT H., HUET C., OSEROFF A.R., SACHS L. (1973_b) Inhibition of lectin Agglutinability by Fixation of the Cell Surface Membrane. Biochim. Biophys. Acta 311. 594-599.

IOACHIM H. (1966). Effects of Phytohemagglutinin in vitro on Cells other than lymphocytes. Nature 210. 919-921.

JI T.H., NICOLSON G.L. (1973). Lectin binding and perturbation of the cell membrane outer surface induce a transmembrane organizational alteration at the inner surface. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 71. 2212-2216.

KAPLOWITZ P.B., MOSCONA A.A. (1973). Stimulation of DNA synthesis by Concanavalin in cultures of embryonic neural retina cells. Biochim. Biophys. Res. Commun. 55. 1326-1333.

KAY J.E. (1968). Early effects of phytohaemagglutinin on lymphocyte RNA synthesis. Europ. J. Biochem. 4. 225-232.

KAY J.E., HANDMAKER S.D. (1970). Uridine incorporation and RNA synthesis during stimulation of lymphocytes by PHA. Exp. Cell Res. 63. 411-421.

KAY J.E., OPPENHEIM J.J. (1971). The specificity of antisera to PHA. in Proceedings of the Fourth Annual Leucocyte Culture Conference,(ed. O.R. Mc Intyre p. 59-67). New York : Appleton - Century Crafts.

KILLANDER D., RIGLER R. (1965). Initial changes of deoxyribonucleoprotein and synthesis of nucleic acid in phytohemagglutinin- stimulated human leucocytes in vitro. Exp. Cell Res. 39. 701-704.

KILLANDER D., RIGLER A. (1969). Activation of deoxyribonucleoprotein in human leucocytes stimulated by phytohemagglutinin. Exp. Cell. Res. 54. 163-170.

KINGSBURY J.M. (1964). "Poisonous Plants of the United States and Canada". Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

KLEINSCHUSTER S.J., MOSCONA A.A. (1972). Interactions of embryonic and fetal neural retina cells with carbohydrate binding phytoagglutinins : cell surface changes with differentiation . Exp. Cell Res. 70. 397-410.

Von KLEIST S. (1971). Etude d'un antigène spécifique de tumeurs coliques humaines d'origine embryonnaire. Biol. Med. LX. 237-292.

KLEINSMITH L.J., ALLFREY V.G., MIRSKY A.E. (1966). Phosphorylation of nuclear protein early in the course of gene activation in lymphocytes. Science 154. 780-781.

KRACH S.W., GREEN A., NICOLSON G., OPPENHEIMER S. (1973). Cell surface changes occuring during sea urchin embryonic development monitored by quantitative agglutination with plant lectins. Exp. Cell Res. 84. 191-198.

KRAM R., TOMKINS G.M. (1973). Pleiotopyc Control by Cyclic AMP; Interaction with Cyclic GMP and Possible Role of Microtubules. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 70. 1659-1663.

KRAMER (1966). Sialic Acid of Mammalian Cell Lines. J. Cell Physiol. 67. 23-34.

LALLIER R. (1972). Effects of Concanavalin A on the development of sea urchin eggs. Exp. Cell Res. 72. 157-163.

LEMONNIER M., BOURRILLON R. (1973). Preparation and characterization of a human pregnancy urine oligosaccharide. Int. Res. Commun. System. (73-9) 3-7-17.

LEMONNIER M., BOURRILLON R. (1976). Characterization and structure of a sialohexasaccharide isolated from Human pregnancy urine. Carbohydrate Res. (sous presse).

LIENER I.E. (1964). Seed hemagglutinins. Economic Botany 18. 27-33.

LIN J.Y., TSERMG K.Y., CHI-CHING C., LIN L.T., TUNG T.C. (1970). Abrin and Ricin : New Anti-Tumour Substances. Nature 227. 292-293.

LING N.R. (1968) In Lymphocyte Stimulation. Amsterdam. North Holland Publishing Co.

LIS H., SELA B., SACHS L., SHARON N. (1970). Specific inhibition by N-acetyl-D-galactosamine of the interaction between soybean Agglutinin and animal Cell surface. Biochim. Biophys. Acta 211. 582-585.

LIS H., SHARON N. (1972). in "Complex Carbohydrates" (Part B). Methods in Enzymology vol.28. (V. Ginsberg ed). p. 360-365. Acad. Press, New York.

LISKE R., FRANKS D. (1968). Specificity of the agglutinin in extracts of wheat germ. Nature 217. 860-861.

LUCAS Z.J. (1967). Pyridine nucleotide synthesis : Regulating control during transformation of lymphocytes in vitro. Science 156. 1257-1259.

MACPHERSON I.A., STOKER M.G.R. (1962). Polyoma Transformation of Hamster Cell clones an investigation of genetic factors. Affecting cell competence. Virology 16. 147-151.

MÄKELÄ O. (1957). Studies in Hemagglutinins of leguminosae Seeds. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 35. Suppl. 11. 1-133.

MALLUCI L. (1971). Binding of Concanavalin A to normal and transformed cells as detected by immunofluorescence. Nature. New Biol. 233. 241-244.

MARTIN E.S., VENUTA S., WEBER M., RUBIN H. (1971). Temperature - Dependent Alteration in sugar transport in Cells infected by a temperature-sensitive Mutant of Rous Sarcoma virus. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 68. 2739-2741.

MARTIN G.R., RUBIN H. (1974). Effects of cell adhesion to the substract on the growth of chick embryo fibroblasts. Exp. Cell Res. 85. 318-333.

MARTINEZ-PALOMO A., BROILOVSKY C., BERNHARD W. (1969). Ultrastructural Modification of the cell surface and Intercellular Contacts of some transformed Cell Strains. Cancer Res. 29. 925-930.

MARTINEZ-PALOMO A., WICKER R., BERNHARD W. (1972). Ultrastructural detection of Concanavalin A surface receptors in normal and polyoma-transformed cells. Int. J. Cancer 9. 676-684.

MARTINEZ-PALOMO A. (1970). The surface Coats of Animal cells. Int. Rev. Cytol. 29. 29-75.

MARTZ E., STEINBERG M.S. (1972). The Role of cell-cell contact in "contact" inhibition of Cell Division. A review and new evidence. J. Cell Physiol. 79. 189-210.

MARTZ E., STEINBERG M.J. (1973). Contact inhibition of what ? An analytical revie
J. Cell Physiol. 81, 25-38.

MEEZAN E., WU H.C., BLACK P.H., RUBBINS P.W. (1969). Comparative Studies on the Carbohydrate. Containing Membrane components of Normal and virus-transformed Mouse Fibroblasts - II. Separation of Glycoproteins and Glycopeptid by Sephadex chromatography. Biochem 8 2518-2524.

MENDELSON J., SKINNER A., KORNFELD S. (1971). The rapid induction by phytohemagglutinin of increased α-aminoisobutyric acid uptake by lymphocytes. J. Clin. Invest 50. 818-826.

METZ J.A. (1972) Ph. D. Thesis. Yale Univ. Press. New Haven Connecticut.

MICHALOWSKI A., JANINSKA I., BRZOSKO W.J., NOWOSLAWSKI A. (1964). Cellular localization of the mitogenic principle of phytohemagglutinin in leucocyte cultures. Exp. Cell Res. 34, 417-419

MOLLER G. (1964). Fluorescent antibody, technic for demonstration of isoantigens. in Methods in Medical Research. 10 p. 58-69. (H.N. Eisen, ed).

MOREAU F., Communication personnelle.

MOREAU F., BOURRILLON R. (1976). Lectin Effect on the biosynthesis of glycoproteins from Zajdela ascite hepatoma cells. (soumise à : Biochem. Biophys. Acta).

MOOREHEAD P.S., NOWELL P.C., MELLMAN W.J., BATTIPS D.M., HUNGERFORD D.A. (1960). Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell. Res. 20. 613-616.

MOSCONA A.A. (1952). Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. Exp. Cell. Res. 3. 35-59.

MOSCONA A.A. (1962). Analysis of cell recombination in experimental synthesis of tissues in vitro. J. Cellular Comp. Physiol. 60. Suppl. 1. 65-80.

MOSCONA A.A. (1963). Studies on cell aggregation : demonstration of materials with selective cell binding activity. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 49. 742-747.

MOSCONA A.A. (1971). Embryonic and Neoplastic cell surfaces : Availability of reeeptors for Concanavalin A and wheat germ agglutinin. Science 171, 905-907.

MUELLER G.C., MAHIEU M.L. (1966). Induction of ribonucleic acid synthesis in human leucocytes by phytohemagglutinin. Biochim. Biophys. Acta 114, 100.

Mc INTYRE O.R., EBAUGH F.G. (1962). The effect of phytohemagglutinin on leucocyte cultures as Measured by ^{32}P Incorporation in the DNA, RNA and Acid soluble fractions. Blood 19. 443-453.

Mc KINNEY A.A., STOHLMAN F., BRECHER G. (1962). The kinetics of cell proliferation in culture of human peripheral blood. Blood 19, 349-358.

NAGL W. (1972). Phytohemagglutinin : temporate Erlohung der mitotischem aktivitat bei allium, und partieller antagonism gege colchicin. Exp. Cell Res. 74. 599-602.

NICOLSON G.L. (1971). Difference in topology of nomal and tumour Cell membranes shown by different surface distribution of ferritine-Conjugated Concanavalin A Nature New Biol. 233. 244-246.

NICOLSON G.L. (1972). Topography of cell membrane Concanavalin A -sites modified by proteolysis. Nature New Biol. 239. 193-197.

NICOLSON G.L. (1973_a). Temperature dependent mobility of Concanavalin A sites on tumour cell surfaces. Nature New Biol. 243. 218-220.

NICOLSON G.L. (1973_b). in "Control of Proliferation in Animal Cells" (B. Clarkson and R. Barserga eds). Cold Spring Harbor Lab., New York.

NICOLSON G.L. (1974). The interactions of lectins with Animal Cell surfaces. Int. Rev. Cytol. 39. 90-190.

NICOLSON G.L., SINGER S.J. (1971). Ferritin conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains for electron microscopy. Application on saccharides bound to cell membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 68. 942-945.

NICOLSON G.L., LACORBIERE M., DELMONTE P. (1972). Outer membrane terminal saccharides of bovine-liver nuclei and mitochondria. Exp. Cell Res. 71. 468-473.

NICOLSON G.L., PAINTER R.C. (1973). Anionic sites of human erythrocyte membranes. II. Antispection-Induced transmembrane Application of the binding sites fo- positively charged Colloïdal Particles. J. Cell Biol. 59. 395-406.

NICOLSON G.L., BLAUSTEIN J., ETZLER M.E. (1974). Characterization of two plant lectins from Ricinus Communis and their quantitative interactions with a Murine lymphoma . Biochem. 13. 196-204.

NOONAN K.D., BURGER M.M. (1973_a). The relationship of Concanavalin A binding to lectin-initiated cell agglutination. J. Cell Biol. 59. 134-142.

NOONAN K.D., BURGER M.M. (1973_b). Binding of ^3H Concanavalin A to normal and transformed cells. J. Biol. Chem. 248. 4286-4292.

NOVOGRODSKY A., BINIAMINOV M., RAMOT B., KATCHALSKI E. (1972). Binding of Concanavalin A to Rat, normal Human and chronic lymphatic Leukaenia lymphocytes. Blood 40. 311-316.

NOVOGRODSKY A., KATCHALSKI E. (1973). Transformation of Neuraminidase treated lymphocytes by Soybean agglutinin. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 70. 2515-2518.

NOWELL P.C. (1960). Phytohemagglutinin : an initiator of natosis in cultures of normal human leucocytes. Cancer Res. 20. 461-466.

OBERLING Ch., BERNHARD W. (1955). L'ultrastructure de la cellule cancéreuse. in Exposés Annuels de Biologie Cellulaire, sous la Direction de J.A. THOMAS. (ed. Masson et Cie). p. 279-306.

OBERLING Ch., BERNHARD W. (1961). The morphology of the cancer cells. in the Cell, Biochemistry, Physiology, Morphology. p. 405-496, vol. 5. (J. Brached et A.E. Mirsky eds. Acad. Press, 6 volumes).

OIKAWA T., NICOLSON G.L., YANAGIMACHI R. (1974). Inhibition of hamster fertilization by phytoagglutinins. Exp. Cell Res. 83. 239-246.

OLSNES S. (1972). Toxic Proteins Inhibiting Protein Synthesis. Naturwissenchaften 59. 497-502.

O'NEILL Ch. Communication personnelle.

OPPENHEIMER S.B., ODENCRANTZ J. (1972). A quantitative assay for measuring cell agglutination : agglutination of sea urchin embryo and mouse teratoma cells by Concanavalin A. Exp. Cell Res. 73. 475-480.

OREN R., KOHN A. (1969). Density dependent inhibition of cell growth in cultures of primary and established lines of cells. J. Cell Physiol. 74. 307-314.

OTTEN J.,JOHNSON G.S., PASTAN I. (1971). Cyclic AMP levels in fibroblasts. Relationship to growth rate and contact inhibition of growth. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44. 1192

OZANNE B., SAMBROOK J. (1971). Binding of radioactively labelled Concanavalin A and virus transformed cells. Nature New Biol. 232. 156-160.

PARDEE A.B. (1971). The surface membrane as a regulator of animal cell division. in Vitro 7. 95-104.

PARDEE A.B., ROZENGURT E. (1974). Role of the surface in production of new cells. in (C.F. Fox, ed). Biochemistry of cell walls, Medical and Technical Publ. Co., London.

PAUL J. (1970). in cell and Tissue Culture E. and S. LIVINGSTONE Edinburg and London ed.

PAUL D., LIPTON A., KLINGER I. (1971). Serum factor requirements of normal and simian virus 40 transformed 3T3 mouse fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 68. 645-648.

PERE M., FONT J., BOURRILLON R. (1974). Poids moléculaire et structure sous-unitaire de la lectine de Dolichos biflorus. Biochim. Biophys. Acta 365. 40-46.

PETERS J.H., HAUSEN P. (1971_a). Effect of phytohemagglutinin on lymphocyte membrane transport. I. Stimulation of uridine uptake. Europ. J. Biochem. 19. 502-508.

PETERS J.H., HAUSEN P. (1971_b). Effect of phytohemagglutinin on lymphocyte membrane transport. II. Stimulation of "facilitated diffusion" of 3-O-methyl-glucose. Europ. J. Biochem. 19. 509-513.

PIERCE G.B., JOHNSON L.D. (1971). Differentiation and Cancer. in Vitro 7. 140-145.

POGO B.G.T., AUFREY V.G., MIRSKY A.E. (1966). RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 55. 803-812.

POGO B.G.T. (1969). The effect of N-acetyl-D-galactosamine and Amantadine hydrochloride on equine lymphocytes stimulated with Phytohemagglutinin. J. Cell Biol. 40. 571-575.

POLLACK R.E., BURGER M.M. (1969). Surface -specific characteristics of a content-inhibited cell line containing the SV40 viral genome. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 62. 1074-1076.

POSTE G. (1971). Changes in susceptibility of normal cells to agglutination by plant lectins following modification of cell coat material. Exp. Cell Res. 73. 319-328.

POWELL A.E., LEON M.A. (1970). Reversible interaction of Human lymphocytes with the mitogen Concanavalin A. Exp. Cell Res. 62. 315-325.

PURDOM L., AMBROSE E.J., KLEIN G. (1958) A correlation between electrical surface change and some biological characteristic during the stepwise progression of a mouse sarcoma.
Nature 181, 1586-1587

RALPH P., MAKOINZ L. (1973). Inhibitory Effects of lectins and lymphocyte Mitogens on Murine lymphomas and Myelomas. J. Nat. Cancer Inst. 51. 883-890.

RAMBOURG A. (1971). Morphological and Histochemical aspects of glycoproteins at the surface of Animal Cells. Int. Rev. Cytol. 31. 57-114.

RAZAVI L. (1966). Cytoplasmic localization of PHA in peripheral white cells. Nature 210. 444-445.

REIN A., RUBIN H. (1968). Effects of local cell concentration upon the growth of chick embryo cells in tissue culture. Exp. Cell Res. 49. 666-678.

RILEY P.A. (1974). The effect on cell proliferation of reduced substrate adhesiveness. Cell differentiation 3. 233-238.

ROBBINS J.H. (1964). Tissue Culture Studies of the Human lymphocyte. Science 146. 1648-1654.

ROBBINS P.W., MACPHERSON I. (1971). Control of Glycolipid Synthesis in a cultured Hamster Cell line. Nature 229. 569-570.

ROGUET R., BOURRILLON R. (1975_a). Interaction between Dolichos biflorus lectin and chick embryonic fibroblasts at different stages of development. Biochim. Biophys. Acta 389. 380-388.

ROGUET R., BOURRILLON R. (1975_b). Changes in lectin - induced Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Cultures of chick-Embryo Fibroblasts at Various Stages of Development. Biochem. J. 152. 421-423.

ROOS D., LOOS J.A. (1970). Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. Biochim. Biophys. Acta 222. 565-582.

ROSENBLITH J.Z., UKENA T.E., HIN H.H., BERLIN R.D., KARNOVSKY M.J. (1973). A comparative evaluation of the distribution of Concanavalin A - binding sites on the surface of normal, vitally transformed and protease-treated fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 70. 1625-1629.

ROTH J. (1974). Distribution of Concanavalin A receptors on normal rat liver cells and Zajdela ascites hepatoma cells. Int. J. Cancer 14. 762-770.

ROTHSTEIN A. (1968). Membrane Phenomena. Ann. Rev. Physiol. 30. 15-72.

RUBIN H. (1971). pH and population density in the regulation of animal cell multiplication. J. Cell. Biol. 51. 686-702.

RUBIN A.D., DAVIS S., SCHULTZ E. (1972). Direct Activation of DNA template in lymphocyte nuclei treated with phytohemagglutinin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46. 2067-2074.

SAGE A.J., VASQUEZ J.J. (1967). Studies on a hemagglutinin from the Mushroom Agaricus campestris. J. Biol. Chem. 242. 120-125.

SAINT-PAUL M. (1961). Les hémagglutinines végétales - Transfusion IV 3-37.

SANFORD K., BARKER B., WOODS M., PARSHAD R., LAW L. (1967). J. Nat. Cancer Inst. 35. 705

SARKANY I., CARON G.A. (1965). Phytohaemagglutinin induced mitotic stimulation of epithelial cells in organ culture of adult human skin. Brit. J. Derm. 77. 439-442.

SCHNEBLI H.P. (1972). A protease-like activity associated with malignant cells. Schweiz Med. Worchenschr. 102. 1194-1197.

SEEDS J. (1965). In Cells and tissues in Culture vol. 1. p. 317-352.

SELA R., SHARON N., SACHS L. (1970). Different locations of carbohydrates containing sites in the surface membrane of normal and transformed mammalian cells. Membrane Biol. 3. 267-279.

SELA B., LIS H., SHARON N., SACHS L. (1971). Quantitation of N-acetyl-D-galactosamine like sites on the surface membrane of normal and transformed mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta 249. 564-568.

SHARIF A. (1975). Induction de la transformation des lymphocytes périphériques humains par la lectine de Robinia pseudoacacia. Comparaison entre les lymphocytes normaux et leucémiques, frais et en lignée continue. Thèse de 3ème Cycle (PARIS VI).

SHARIF A., BOURRILLON R. (1975). Human peripheral lymphocyte transformation induced by the Robinia lectin. Cell. Immunology 19. 372-380.

SHARON N., LIS H. (1972). Lectins : Cell-agglutinating and Sugar-Specific proteins. Science 177. 949-959.

SHARON N., LIS H. (1974). Use of lectins for the study of Membranes. in Methods Membrane Biology 3. 245-246. Eds E.O. KA Publishers.

SHEPPARD J.R. (1971). Restoration of contact inhibited growth to transformed cells by dibutyryl Adenosine 3', 5' cyclic monophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci.US. 68. 1316-1320.

SHEPPARD J.R. (1972). Difference in the Cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate levels in Normal and transformed Cells. Nature New Biol. 236. 14-16.

SHOHAM J., INBAR M., SACHS L. (1970). Differential toxicity on Normal and Transformed cells in vitro and Inhibition of tumour Development in vivo by Concanavalin A. Nature 227. 1244-1246.

SHOHAM J., SACHS L. (1972). Differences in the Binding of Fluorescent-Concanavalin A to the Surface Membrane of Normal and Transformed Cells. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 69. 2479-2482.

SINGER S.J., NICOLSON G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. Science 175. 720-731.

SIVAK A. (1971). Agglutinin Interaction with Embryonic and Adult Cell Surfaces. Science 173 264-265.

SMITH C.W., HOLLERS J.C. (1970). The pattern of binding of fluorescein-labelled Concanavalin A to the nodule lymphocytes. J. Reticulo-endoth. Soc. 8. 458-464.

SMITH J.W., STEINER A.L., NEWBERRY W.M., PARKER C.W. (1971). Cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate in human lymphocytes. Alteration after phytohemagglutinin stimulation. J. Clin. Invest. 50. 432-441.

SMITH S.B., REVEL J.P. (1972). Mapping of Concanavalin A Binding Sites on the Surface of several cell types. Develop. Biol. 27. 434-441.

STAMBROOK F.J., SISKEN J.E., EBERT J.D. (1973). Uridine Uptake and its intracellular Phosphorylation during the Cell Cycle. J. Cell Physiol. 82. 267-276.

STECK T.L., WALLACH D.F.M. (1965). The binding of Kidney Bean Phytohemagglutinin by Ehrlich Ascite carcinoma. Biochim. Biophys. Acta 97. 510-522.

STEIN M.D., SAGE H.J. (1972). Studies on a Phytohemagglutinin from the Lentil. V. Binding of Lens culinaris Hemagglutinin to lymphocytes and Erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 150. 412-420.

STEINBERG M.S. (1968). Avian and mammalian cell dissociation. in "Methods in Developmental Biology" (F.Wilt et N. Wessels eds) p. 565-572. Thomas Y Crowell New York.

STILLMARK H. ((1888) Inaug. Diss. Univ. Dopart, Dopart, Germany. Cité par NICOLSON.

STOKER M.G.P., RUBIN H. (1967). Density dependent inhibition of cell growth in culture. Nature 215. 171-172.

STONEHILL E.H., BENDICH A. (1970). Retrogenic expression : the reappearance of embryonal antigens in Cancer cells. Nature 228. 370-371.

SUTHERLAND E.W., RALL T.W., MEMON T. (1962). Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation and properties. J. Biol. Chem. 237. 1220-1227.

TASPER H.G., BRASEL J.A. (1973). The effect of Growth Hormone on DNA Polymerase Activity in the liver of Normal and Hypophysectomized Rats. Endo. 92. 194-205.

TEMIN H.M. (1971). Stimulation by serum of Multiplication of stationary chicken cells. J. Cell Physiol. 78. 161-170.

TORPIER G., MONTAGNIER L. (1973). Studies of the ultrastructure of Concanavalin A receptor sites at the surface of normal cells and cells transformed by oncogenic virus. Int. J. Cancer 11. 604-615.

TRINKAUS J.P. (1968). in Major Problems in developmental biology. (M. Locke, ed). p. 125, Academic Press, New York.

TRONCHET J.M.J. (1961). Les phytohémagglutinines des Angiospermes : Aspects actuels de la question. Annales Sci. Univ. Besançon 2ème série Botanique 17. 89-113.

VENUTA S., RUBIN H. (1973). Sugar transport in Normal and Rous Sarcoma virus-transformed chick-Embryo Fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 70. 653-657.

VOGT M., DULBECCO R. (1960). Virus Cell Interactions with a tumor-producing virus. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 46. 365-370.

WALLACH D.F. (1968). Cellular Membranes and tumor behavior ; A new Hypothesis. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 61. 868-874.

WARREN L., CRICHLEY D., MACPHERSON I. (1972) Surface glycoproteins and glycolipids of chicken Embryo Cells transformed by a temperature-sensitive mutant of Rous Sarcoma virus. Nature 248, 273-277

WARREN L., FUHRER J.P., BUCK C.A. (1973). Surface glycoproteins of cells before and after transformation by oncogenic viruses. Fed. Proc. 32. 80-85.

WEISER M.M. (1972). Concanavalin A Agglutination of Intestinal Cells from the human Fetus. Science 177. 525-526.

WEISS L. (1961). Studies on cellular adhesion in tissue culture. IV. The alteration of substrata by cell surfaces. Exp. Cell Res. 25. 504-517.

WEISS L. (1969). The Cell Periphery. Int. Rev. Cytol. 26 63-105.

WILLINGHAM M.C., PASTAN I. (1975). Cyclic AMP Modulates Microvilli formation and Agglutinability of Transformed and Normal Mouse Fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. US. 72. 1263-1267.

WINZLER R.J. (1970). Carbohydrates in Cell Surfaces. Int. Rev. Cytol. 29. 77-97.

WHITTAKERT J. (1967). Loss of metabolitic phenotype in vitro by differentiated retinal pigment cells : demonstration of mechanism involved. Develop. Biol. 25. 553-574.

YAHARA I., EDELMAN G.M. (1973). The effect of Concanavalin A on the mobility of lymphocyte surface receptors. Exp. Cell Res. 81. 143-155.

YAHARA I., EDELMAN G.M. (1973). Modulation of lymphocyte receptor distribution by Concanavalin A, antimitotic agents and alteration of pH. Nature 246 152-155.

YIM H.H., UKENA T.E., BERLIN R.D. (1972). Effect of colchicine, colcemid and vinblastine on the agglutination by Concanavalin A of transformed cells. Science 178. 867-868.

ZECH L. (1966). The effect of phytohemagglutinin on growth and DNA synthesis of some protozoa. Exp. Cell. Res. 44. 312-320.

ZILLHART P., communication personnelle.

APPENDICE

APPENDICE

I - Milieu de EAGLE (MEM)

- solution saline équilibrée de EAGLE (1943) comprenant en g/l : NaCl : 6,80 KCl : 0,40 - $CaCl_2$: 0,20 - $MgSO_4$ (H_2O) : 0,1 - $NaHPO_4$: 0,125 - glucose : 1 phénol réduit : 0,05 - $NaHCO_3$: 2,20.
- Aminoacides en g/l : L Arginine HCl : 0,042 - L Cystine : 0,024 - L Tyrosine : 0,036 - L Histidine : 0,016 - L Isoleucine : 0,02 - L Leucine : 0,052 - L Lysine : 0,052 - L Méthionine : 0,015 - L Phénylalanine : 0,023 - L Thréonine 0,048 - L Tryptophane : 0,008 - L Valine : 0,047 - L Glutamine : 0,584.
- Vitamines en g/l : Biotine, Acide folique, Choline chlorure, Nicotamide, D Pantothénate Ca, Pyridoxal HCl, Thiamine HCl : 0,002 - Riboflavine : 0,0002 - Inositol : 0,0036.
  Le milieu de culture est additionné de Pénicilline Spécia (200 u/ml) et de Streptomycine Spécia (1 mg/ml).

II - Milieu de EAGLE, modifié selon Dulbecco

- Solution saline équilibrée comprenant en g/l : NaCl : 6,4 - KCl : 0,40 $CaCl_2$: 0,20, $M-SO_4$, 7 H_2O : 0,20 - Na H_2PO_4, H_2O : 0,124 - D-glucose 1 - Fe $(NO_3)^3$, 9 H_2O : 0,001 - $NaHCo_3$: 3,7 - Rouge de Phénol : 0,15.
- Aminoacides en g/l : L Arginine HCl 0,084 - Glycocolle 0,0300 - L-glutamine 0,58 - L-cystéine 0,048 - L Histidine HCl H_2O : 0,042 - L Isoleucine 0,105 L lysine HCl 0,146 - L Méthionine : 0,030 - L Phénylalanine : 0,066 - L Sérine : 0,042 - L Thréonine : 0,095 - L Tryptophane : 0,016 - L Tyrosine : 0,072 - L Valine : 0,094.
- Vitamines en g/l : D-Ca pantothénate : 0,004 - Choline chlorure 0,004 - Nicotinamide 0,004 - Pyridoxal HCl : 0,004 - Riboflavine : 0,001 - Thiamine : 0,004 - Pénicilline : 20 000 u - Streptomycine : 0,02.

III - Formolsaline

Formol 10 % en solution saline comprenant en g/l : NaCl 5, Na_2SO_4 15
Dissoudre dans 800 ml d'eau distillée. Ajouter 100 ml de formaldéhyde 40 % filtrée. Ajuster pour 1 l.

IV - Solution saline TRIS

- Solution saline équilibrée TRIS comprenant en g/l : NaCl : 8 - KCl à 19 % 2 ml - Na_2HPO_4 0,1 - glucose 1 - Tris (hydroxymethyl) amino méthane : 3 - Rouge de phénol à 1 % : 1,5 ml - Pénicilline 100 000 u - Streptomycine : 0,1 pH 7,4.

V - Alun de chrome

- Alun de chrome : dont la composition en g/l est : gélatine : 5 - alun de chrome : 0,5.

VI - Produits nécessaires à l'autoradiographie

. Film AR 10 Kodak
. Révélateur D 19 Kodak
. Fixateur Ilford.

VII - Colorant de Giemsa (R.A.L.)

Ce colorant est filtré, et dilué au 1:5 dans l'eau distillée. La coloration est obtenue après 25 minutes ; les boites de cultures sont lavées à l'eau puis séchées.